



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EL PAPEL DE LOS RUMIANTES EN LA EVOLUCIÓN DE ENTEROBACTERIAS
PATÓGENAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

M. en C. JONATHAN JOSUÉ LÓPEZ ISLAS

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ

CODIRECTORA: DRA. ESTELA T. MÉNDEZ OLVERA

ASESORA: DRA. LIZETH GUADALUPE CAMPOS MUZQUIZ

CIUDAD DE MÉXICO

17 JULIO 2026

El papel de los rumiantes en la evolución de enterobacterias patógenas de importancia en salud pública

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL:

Director
Dr. Daniel Martínez Gómez



CoDirectora
Dra. Estela Teresita Méndez Olvera



Asesora
Dra. Lizeth Guadalupe Campos Múzquiz



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 1.	28
CAPÍTULO 2.	33
CAPÍTULO 3.	101
DISCUSIÓN GENERAL	151
CONCLUSIÓN GENERAL	153

Resumen

En este trabajo se analizó el papel de los bacteriófagos en la evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*, centrándose en la transferencia horizontal de genes (THG) de virulencia y resistencia antimicrobiana (GRAs). Para el estudio de este fenómeno se emplearon nueve cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV), recuperadas de carnívoros y bisontes silvestres de la Reserva de la Biósfera de Janos, México, con el fin de demostrar la existencia de bacteriófagos en el genoma de las nueve cepas de *E. coli* PGV y evaluar su participación en la THG de factores de virulencia (FV) y genes de resistencia antimicrobiana (GRA), entre las cepas de *E. coli* PGV. Además de evaluar la participación del líquido ruminal, como componente del microambiente ruminal, en la inducción de bacteriófagos portadores de GRA y FV, con el fin de establecer el papel de los rumiantes en la evolución de enterobacterias.

En una primera fase se realizó un análisis metagenómico de partículas virales aisladas de muestras intestinales de coyotes silvestres, con el fin de establecer los bacteriófagos presentes en el microambiente intestinal y la presencia de FV y GRA. Esto debido a que el coyote es una de las especies reportadas como reservorio de enterobacterias patógenas de importancia en salud pública y que, además, puede convivir con rumiantes domésticos y silvestres. Los resultados revelaron la presencia de 59 genes de resistencia a antibióticos distribuidos en 59 especies de bacteriófagos, mostrando que los bacteriófagos pueden almacenar y transportar este tipo de genes, sugiriendo que podrían comportarse como reservorios ambientales de material genético.

Durante la segunda fase, se evaluó la capacidad del líquido ruminal para inducir la liberación de bacteriófagos, para lo cual nueve cepas de *E. coli* PGV fueron tratadas con líquido ruminal, proveniente de tres bovinos, en concentraciones de 50%, 75% y 100%. El líquido ruminal fue filtrado con membranas de 0.8, 0.4 y 0.22 micras y suplementado con caldo Luria-Bertani (LB) con la finalidad de evitar la presencia de bacterias y la falta de nutrientes, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que el líquido ruminal indujo la liberación de bacteriófagos; entre estos, los que portan genes de virulencia como los que codifican para las shigatoxinas. Estos hallazgos establecen la importancia de los rumiantes como catalizador ecológico que participa en la evolución de enterobacterias patógenas a través de la THG mediada por fagos, con implicaciones para la salud pública.

En la tercera fase, se realizó un análisis metagenómico de los bacteriófagos inducidos con mitomicina C a partir de nueve cepas de *E. coli* PGV, con la finalidad de evaluar la dinámica de especies de bacteriófagos presentes en dichas cepas, así como su posible participación en la THG y en la evolución de las cepas de *E. coli* PGV recuperadas de fauna silvestre de la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua. Se identificó la presencia de 49 especies de bacteriófagos y ensamblar 36 genomas completos. Asimismo, se detectaron 179 factores de virulencia y 59 genes de resistencia antimicrobiana, los cuales se encuentran distribuidos entre las distintas especies de bacteriófagos presentes en las nueve cepas de *E. coli* PGV.

Finalmente, se observó que las especies de bacteriófagos presentes en estas cepas conforman una metacomunidad con una estructura tipo 'tablero de ajedrez'. Esta configuración sugiere la existencia de interacciones competitivas y procesos de exclusión mutua entre grupos de bacteriófagos, limitando su coexistencia en una misma cepa. Dicha dinámica de exclusión podría condicionar la adquisición de genes de virulencia y resistencia específicos en cepas de *E. coli*. En conjunto, estos resultados indican que, a pesar de estas restricciones competitivas, la población de fagos actúa como un motor que promueve el flujo génico mediante THG entre las diversas cepas analizadas.

Abstract

This study analyzed the role of bacteriophages in the evolution of pathogenicity in *Escherichia coli*, focusing on the horizontal gene transfer (HGT) of virulence and antimicrobial resistance genes (ARGs). To investigate this phenomenon, nine *E. coli* strains carrying virulence genes (VGC) were used. These strains were recovered from wild carnivores and bison inhabiting the Janos Biosphere Reserve, Mexico, with the aim of demonstrating the presence of bacteriophages within the genomes of the nine *E. coli* VGC strains and evaluating their participation in the HGT of virulence factors (VFs) and antimicrobial resistance genes among the studied strains. In addition, the role of ruminal fluid, as a component of the ruminal microenvironment, in the induction of bacteriophages carrying ARGs and VFs was evaluated in order to establish the role of ruminants in the evolution of enterobacteria.

In the first phase, a metagenomic analysis of viral particles isolated from intestinal samples of wild coyotes was performed to identify the bacteriophages present in the intestinal microenvironment, as well as the occurrence of VFs and ARGs. This approach was based on the fact that coyotes have been reported as reservoirs of pathogenic enterobacteria of public health importance and are capable of coexisting with both domestic and wild ruminants. The results revealed the presence of 59 antibiotic resistance genes distributed among 59 bacteriophage species, demonstrating that bacteriophages are capable of storing and transporting this type of genetic material, suggesting that they may act as environmental reservoirs of genes.

During the second phase, the ability of ruminal fluid to induce bacteriophage release was evaluated. For this purpose, nine *E. coli* VGC strains were treated with ruminal fluid obtained from three cattle at concentrations of 50%, 75%, and 100%. The ruminal fluid was filtered through 0.8, 0.4, and 0.22 μm membranes and supplemented with Luria-Bertani (LB) broth in order to prevent bacterial contamination and nutrient depletion, respectively. The results demonstrated that ruminal fluid induced the release of bacteriophages, including those carrying virulence genes such as shiga toxin-encoding genes. These findings highlight the importance of ruminants as ecological facilitators involved in the evolution of pathogenic enterobacteria through phage-mediated HGT, with potential implications for public health.

In the third phase, a metagenomic analysis of bacteriophages induced with mitomycin C from the nine *E. coli* VGC strains was conducted in order to evaluate the ecological dynamics of the bacteriophages present in these strains, as well as their potential participation in HGT and in the evolution of *E. coli* VGC strains recovered from wildlife inhabiting the Janos Biosphere Reserve, Chihuahua. A total of 49 bacteriophage species were identified, and 36 complete genomes were assembled. Furthermore, 179 virulence factors and 59 antimicrobial resistance genes were detected and found to be distributed among the different bacteriophage species present in the nine *E. coli* VGC strains.

Finally, the bacteriophage species identified in these strains were found to form a metacommunity with a checkerboard structure. This configuration suggests the existence of competitive interactions and mutual exclusion processes among bacteriophage groups, limiting their coexistence within the same bacterial strain. Such exclusion dynamics may influence the acquisition of specific virulence and resistance genes in *E. coli* strains. Overall, these findings indicate that, despite these competitive constraints, phage populations act as a driving force promoting gene flow through HGT among the different strains analyzed.

Introducción general

Escherichia coli es una de las especies bacterianas que presenta una elevada variabilidad genética (Chaudhuri y Henderson 2012). En comparación con otras enterobacterias, en *E. coli* se han descrito las mayores diferencias genéticas entre cepas patógenas y comensales (Dobrindt et al., 2010). Las diferencias genéticas observadas entre distintas cepas aisladas en diferentes regiones del mundo se han atribuido a su capacidad de adaptación, esto les permite a las diferentes variantes de *E. coli* colonizar ambientes intestinales y extraintestinales (Denamur et al., 2021).

Esta capacidad adaptativa deriva de modificaciones en su genoma -como mutaciones, deleciones y procesos de duplicación- y, principalmente, de procesos de transferencia horizontal de genes (THG). Estos últimos incluyen la transducción, la conjugación y la transformación, y se ven incrementados por la recombinación de elementos genéticos móviles (Dobrindt et al., 2010). Estas modificaciones genómicas, impulsadas por el flujo génico y los reordenamientos constantes del genoma, le confieren a *E. coli* ventajas competitivas frente a otros microorganismos e incluso entre variantes genéticas de *E. coli* (Leimbach et al., 2013).

En el caso particular de *E. coli*, se ha documentado una extensa adquisición de material genético, junto con una notable habilidad para regular y mantener dichos elementos. Esto le otorga ventajas críticas para la supervivencia, la patogenicidad y la multirresistencia a los antimicrobianos. Este dinamismo para integrar y gestionar nuevo material genético se define como plasticidad genómica (Patel, 2016; Vila et al., 2016; Touchon et al., 2009). Esta arquitectura genómica flexible explica por qué cepas filogenéticamente cercanas pueden comportarse como cepas comensales en el intestino o como patógenas extraintestinales, donde un mismo rasgo genético confiere ventajas en el entorno intestinal y, simultáneamente, promover la infección fuera del intestino (Leimbach et al., 2013).

El análisis de 20 genomas completos de *E. coli*, incluyendo cepas comensales y patógenas, así como un genoma de *Escherichia fergusonii*, reveló la presencia de un genoma núcleo compuesto por 1,976 genes compartidos, en contraste con un pangenoma de 17,838 genes identificados en el conjunto de las 20 cepas analizadas. Estos resultados permitieron clasificar el genoma de *E. coli* en dos componentes: el genoma núcleo, altamente conservado y con menor influencia de elementos genéticos móviles, y el genoma extendido o flexible, que incluye secuencias asociadas a sitios de inserción, integración de bacteriófagos, plásmidos y otros elementos genéticos móviles. El genoma núcleo representa aproximadamente el 42% (1,976 genes compartidos) del contenido genómico de una cepa promedio, mientras que el 58% restante corresponde al genoma extendido, el cual contiene en promedio 4,721 genes por cepa de *E. coli*. Este componente genómico fue adquirido principalmente mediante eventos de transferencia horizontal de genes, como la conjugación, la transducción y la transformación (Touchon et al., 2009).

Las diferencias genéticas entre las distintas cepas de *E. coli*, particularmente en la presencia de genes asociados a la patogenicidad, han permitido su clasificación en tres grandes grupos: cepas comensales intestinales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales. Cada uno de estos grupos presenta características específicas de patogenicidad, las cuales derivan de la presencia y combinación de distintos factores de virulencia en su genoma (Croxen et al., 2013).

Entre las variantes patógenas de *E. coli* existen diferentes criterios de clasificación. Uno de ellos se basa en el sitio donde ejerce sus mecanismos de patogenicidad, dividiéndose en: *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) y *E. coli* patógenas intestinales (IPEC), como ya se mencionó. Otra pauta en la clasificación de los aislados patógenos de *E. coli* es por su patogenia asociado a la presencia de factores de virulencia (FV) en su genoma, a esta categorización se le denomina patotipos (Riley, 2020). Dentro de los patotipos descritos en

las ExPEC están: *E. coli* uropatógena (UPEC), la cual es causante de infecciones en tracto urinario, *E. coli* neonatal meníngea (NMEC) causante de infecciones en líquido espinal en neonatos, *E. coli* patógena aviar (APEC) causante de colibacilosis aviar, *E. coli* septicémica (SePEC) causante de septicemias en humanos y animales, *E. coli* patógena endometrial (EnPEC) causante de infecciones en endometrio (Lindstedt et al., 2018). Los patotipos descritos para los aislados IPEC causantes de distintos procesos diarreogénicos están: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* adherente-invasiva (AIEC) (Denamur et al., 2021). No obstante, se han descrito variantes patógenas que no pueden ser incluidas dentro de los patotipos previamente establecidos, esto es debido a que presentan combinaciones de FV y cuadros clínicos atípicos (Lindstedt et al., 2004).

En un intento por proponer un sistema de clasificación capaz de establecer similitudes genéticas, Clermont y colaboradores (2000) desarrollaron un sistema de genotipificación basado en el análisis de tres marcadores genéticos: *yjaA*, *chuA* y un fragmento de ADN denominado TSPE.C2. Este sistema permitió dividir a *E. coli* en cuatro filogrupos principales: A, B1, B2 y D. Con este sistema, se observó que los filogrupos B2 y D contenían la mayor parte de las cepas con potencial patógeno.

Posteriormente, Gordon y colaboradores (2008), al analizar distintas colecciones de cepas mediante este sistema, identificaron inconsistencias en la clasificación. Observaron una tendencia a agrupar cepas en el filogrupo A ante la ausencia de amplificadores específicos, lo que reducía la exactitud del método; asimismo, detectaron cepas que no se ajustaban a ninguno de los filogrupos establecidos. Por ello, complementaron este análisis con una tipificación por secuencias multilocus (MLST), mediante la cual identificaron un grupo adicional de cepas que no se ajustaban a los cuatro filogrupos originalmente descritos, proponiendo así un nuevo filogrupo denominado "E". Este grupo había sido previamente sugerido como una población de cepas de *Escherichia coli* con una estructura genética distinta dentro de la colección ECOR por Ochman y Selander (1984), aunque en ese momento no fue designado formalmente como el filogrupo E.

Más adelante, Clermont y colaboradores (2013) diseñaron un método actualizado que permitió identificar no solo los cuatro filogrupos iniciales (A, B1, B2 y D) y el filogrupo E, sino también la incorporación de dos nuevos filogrupos adicionales, denominados C y F.

El establecimiento de estos filogrupos permitió asociar determinadas características genéticas del genoma de *E. coli* con su potencial patogénico, vinculando la presencia de factores de virulencia con rasgos genéticos específicos. Bajo este enfoque, se planteó la hipótesis de que algunos filogrupos albergaban una mayor proporción de cepas patógenas en comparación con otros filogrupos (Duriez et al., 2001; Escobar-Páramo et al., 2004). Inicialmente, este enfoque permitió observar que la mayoría de las cepas patógenas se agrupaban dentro de los filogrupos B2 y D (Clermont et al., 2013).

La presencia de distintos filogrupos en diferentes cepas ha permitido analizar la estructura de las poblaciones de *E. coli*. Se ha observado una mayor prevalencia del filogrupo A (50-63%) en áreas tropicales, mientras que en áreas templadas predominan los filogrupos B2 (29-48%) y D (19-29%). Además, se ha observado una correlación entre la presencia de los filogrupos B2 y D y su lugar de origen, sugiriendo que las cepas que pertenecen a los filogrupos B2 y D podrían ocupar nichos similares en el intestino humano (Escobar-Páramo et al., 2004a).

Sin embargo, conforme se han analizado cepas provenientes de distintos animales se ha observado que el filogrupo B2 no es el único que alberga cepas con potencial patogénico, y que los factores de virulencia se distribuyen entre distintos filogrupos (Coura et al., 2017).

Un ejemplo de esto es lo observado por Ghanbarpour y colaboradores (2011), quienes al analizar 253 aislados de *E. coli* —141 aislados provenientes de aves con colibacilosis septicémica y 112 aislados de *E. coli* de heces de aves sanas— detectaron la presencia de los filogrupos A, B1, B2 y D en ambos grupos. Además, identificaron la presencia de FV en aves sanas y detectaron que la mayoría de los aislados estaban localizados en el filogrupo A.

Además, se han recuperado aislados que no logran asignarse dentro de los filogrupos descritos, lo que ha generado la necesidad de incorporar nuevos filogrupos en las que también se observa la presencia de genes de virulencia (Lu et al., 2016). Asimismo, el análisis de cepas de origen animal ha demostrado que los filogrupos asociados con factores de virulencia no corresponden necesariamente a los grupos B2 y D, a diferencia de lo que ocurre con mayor frecuencia en aislados de origen humano (Jajarmi et al., 2017; Jajarmi et al., 2018; Tayh et al., 2022).

Uno de los filogrupos recientes es el filogrupo G, el cual ha sido reportado como altamente virulento y con un perfil de multirresistencia a antimicrobianos (Clermont et al., 2019). No obstante, la distribución de los factores de virulencia parece ser en gran medida independiente del filogrupo, lo que refleja la amplia variabilidad genética existente entre las distintas cepas de *E. coli* (Aguirre-Sánchez et al., 2022; Bohlin et al., 2014; Kaper et al., 2004).

Las diferentes combinaciones de los FV identificadas en los diversos filogrupos sugieren que no existe una característica genética única asociada con la ganancia de virulencia, es decir, un rasgo específico que determine de manera directa la adquisición de genes de virulencia. No obstante, en un intento por asociar la capacidad de adquirir virulencia con características genéticas propias de *E. coli*, algunos estudios han propuesto enfoques alternativos a la clasificación por filogrupos para analizar y establecer las condiciones que favorecen la adquisición de genes de virulencia (Escobar-Páramo et al., 2004).

En este contexto, García-Gutiérrez y colaboradores (2015) sugirieron que la ganancia de genes de virulencia en cepas patógenas podría estar asociada con el sistema CRISPR. Al intentar correlacionar las variaciones genéticas en los sistemas CRISPR presentes en *E. coli* con su capacidad para eliminar o mantener nuevas secuencias genéticas, los autores observaron una correlación negativa, además de evidenciar que los sistemas CRISPR presentes en distintas cepas de *E. coli* son altamente heterogéneos, lo que indica una considerable variabilidad incluso dentro de este sistema de defensa.

Por otra parte, Bohlin y colaboradores (2014), mediante el análisis comparativo del genoma de distintas cepas de referencia de *E. coli*, evaluaron variaciones en genes específicos, como el gen *mut*. Sus resultados indicaron que el genoma núcleo está sujeto a una mayor presión de selección, además sugirieron que los filogrupos A y B1 han estado bajo la misma presión de selección y por eso comparten características en su genoma núcleo. Esto sugiere que el genoma núcleo se encuentra bajo una mayor presión de selección que el genoma extendido. No obstante, este fenómeno no explica completamente los mecanismos responsables de la expansión del genoma de *E. coli*.

Los genes del sistema *mut*, como *mutL* y *mutT*, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad genómica de *E. coli*. El gen *mutL* participa en el sistema de reparación de errores de apareamiento del ADN, mientras que *mutT* elimina nucleótidos oxidados, como la 8-oxo-dGTP, evitando su incorporación al ADN y reduciendo la acumulación de mutaciones. En conjunto, estos mecanismos contribuyen a la conservación del genoma núcleo. Sin embargo, alteraciones o mutaciones en los genes del sistema *mut* pueden conferir a *E. coli* un fenotipo mutador, caracterizado por un incremento en la tasa de mutación. Este fenotipo se ha asociado con mutaciones en *rpoS*, un gen involucrado en la

respuesta al estrés celular, así como con modificaciones en la regulación de bombas de eflujo relacionadas con la expulsión de antibióticos y la supervivencia bacteriana (Desroches et al., 2018).

En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de filogrupos y su posible asociación con cepas patógenas podría ser consecuencia de un proceso evolutivo, en el cual la ganancia de virulencia está determinada por una presión de selección constante sobre determinados grupos de genes, así como por la capacidad de regular el material genético adquirido (Touchon et al., 2009).

Cabe destacar que, en la mayoría de estos estudios, se utilizaron cepas aisladas de distintos hospedadores y de diversas regiones geográficas, incluyendo aquellas pertenecientes a *E. coli* Reference Collection (ECOR). Esta heterogeneidad biológica podría enmascarar algunas correlaciones, dado que los procesos evolutivos intervienen fuerzas genéticas como las mutaciones, la deriva génica, el flujo génico y la selección natural, las cuales determinan la microevolución; así como por factores espaciales y temporales — como el tiempo geológico, los cambios ambientales y el aislamiento geográfico— que influyen en la macroevolución (Tsuboi et al., 2024; Kearney et al., 2024). Los factores espaciales y temporales (heterogeneidad biológica) pueden dificultar la detección de patrones evolutivos en estudios a gran escala, especialmente en microorganismos, los cuales presentan procesos evolutivos más rápidos (Chase y Myers, 2011).

A pesar de estas dificultades, la comprensión de los mecanismos que impulsan la divergencia evolutiva de *E. coli* puede abordarse desde aproximaciones complementarias. Por un lado, la macroecología de enfermedades infecciosas ofrece un marco para identificar factores determinantes de la distribución de patógenos, integrando factores espaciales y temporales a gran escala (Stephens et al., 2016). Por otro lado, los experimentos de evolución a largo del tiempo, como el *Long-Term Evolution Experiment* (LTEE) iniciado en 1988 por Richard Lenski, permiten cuantificar la dinámica de la adaptación por selección natural y conocer el papel de las mutaciones en la adaptación bacteriana en condiciones controladas, demostrando fenómenos como cambios en las tasas de mutación y evolución paralela de genes (Lenski, 2017).

Adicionalmente, la THG, mediada por mecanismos como la transformación, la conjugación y la transducción por bacteriófagos, constituye una fuente de variación genética que permite a *E. coli* adquirir rápidamente genes de virulencia y de resistencia a antimicrobianos (Dobrindt et al., 2010). En conjunto, estas aproximaciones (macroecológicas, experimentales y moleculares) permiten conocer las limitaciones impuestas por la heterogeneidad biológica, y ofrecen un marco integrador para entender la evolución de *E. coli* como un proceso donde la presión de selección ambiental moldea la variación genética generada por mutaciones y flujo génico horizontal, fenómeno conocido como ecoevolución (Dobrindt et al., 2010; Stephens et al., 2016).

Este proceso ecológico-evolutivo ha favorecido la generación de cepas de *E. coli* con distintos genes de virulencia y de resistencia a antimicrobianos. Entre las variables que podrían ejercer presión de selección y, al mismo tiempo, contribuir al enriquecimiento genético del genoma de *E. coli*, destaca la presencia de determinados grupos de bacteriófagos (Dobrindt et al., 2010). Los bacteriófagos pueden actuar como componentes ambientales clave, funcionando como elementos ecológicos que favorecen la aparición de nuevas variantes patógenas al proporcionar nuevo material genético y ejercer presión de selección sobre microorganismos susceptibles (Boyd et al., 2001).

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus capaces de infectar distintos géneros bacterianos y actúan como moduladores claves de las comunidades microbianas (Chevallereau et al., 2021). Los bacteriófagos se encuentran presentes en todos los

microambientes, donde también existe la presencia de bacterias. En términos generales, se estima que la población de bacteriófagos supera a la de bacterias en una proporción aproximada de diez a cien por cada bacteria (Hatfull, 2015). Como reguladores de las comunidades bacterianas, los bacteriófagos ejercen una presión de selección importante sobre los microorganismos susceptibles (Klimenko et al., 2016). Esta modulación ocurre, por un lado, debido a la lisis de bacterias susceptibles a la infección y, por otro, porque los bacteriófagos funcionan como vectores eficientes para la transferencia de material genético (Bakhshinejad y Ghiasvand, 2017).

La presencia de bacteriófagos en ambientes específicos obliga a las bacterias, en este caso *E. coli*, a desarrollar mecanismos de supervivencia frente a las infecciones por bacteriófagos. Estos incluyen evitar la unión del bacteriófago, la degradación del material genético exógeno, los sistemas de restricción-modificación, los sistemas CRISPR-Cas, así como mecanismos de muerte celular y la inhibición del ensamblaje de proteínas estructurales de bacteriófagos (Mirzaei y Maurice, 2017; Georjon y Bernheim, 2023). Sin embargo, las bacterias que sobreviven a una infección por bacteriófagos pueden adquirir nuevo material genético, dando origen a variantes patógenas como ocurre en *E. coli* (Dobrindt, 2005; Fortier y Sekulovic, 2013).

El material genético transferido por los bacteriófagos puede incluir genes involucrados en la síntesis de carbohidratos, genes involucrados en funciones metabólicas, toxinas y genes asociados a la resistencia a antimicrobianos, lo cual favorece el crecimiento y la supervivencia bacteriana bajo condiciones ambientales específicas (Borodovich et al., 2022). Esta presión de selección puede entenderse de dos maneras. En primer lugar, aquellas bacterias que carecen de mecanismos para evitar la infección por bacteriófagos o que no poseen la capacidad de integrar y regular genes del bacteriófago serán lisadas, lo que provoca una disminución en la abundancia de determinados géneros o poblaciones bacterianas (Klimenko et al., 2016). En contraste, las bacterias que logren integrar el material genético del bacteriófago sobreviven, dando lugar a poblaciones bacterianas portadoras de bacteriófagos que pueden adquirir nuevas características genéticas, entre ellas factores de virulencia, genes de resistencia y mecanismos de defensa en contra de infecciones (Mirzaei y Maurice, 2017).

Los bacteriófagos pueden presentar distintos ciclos de infección. Uno de ellos es el ciclo lisogénico, el cual representa una vía fundamental para la transferencia de material genético, ya que durante este proceso el genoma viral se integra en el cromosoma bacteriano y se replica de manera constante junto con el genoma del hospedero, una vez que se ha integrado al genoma bacteriano recibe el nombre de profago (Chevallereau et al., 2021).

El otro ciclo de infección es el ciclo lítico, en este ciclo, una vez que la bacteria es infectada, el bacteriófago inicia la replicación de nuevos viriones utilizando la maquinaria celular del hospedero. Posteriormente, la bacteria es lisada para permitir la liberación de las partículas virales al medio. A nivel poblacional, este proceso genera una reducción en la abundancia de determinados géneros bacterianos, influyendo de manera directa en la dinámica poblacional de las comunidades microbianas (Chevallereau et al., 2021).

Cabe destacar que los profagos pueden escindirse del genoma bacteriano e iniciar un ciclo lítico cuando el hospedador es sometido a condiciones de estrés, como el daño al ADN. Este proceso ocurre debido a que muchos bacteriófagos atemperados (aquellos bacteriófagos que una vez integrados mantienen un ciclo lisogénico hasta que diversas condiciones les permiten escindirse e iniciar un ciclo lítico) dependen del sistema RecA activo durante la respuesta SOS al daño genético. Durante la inducción lítica, el genoma del bacteriófago es replicado, empaquetado y liberado tras la lisis celular, permitiendo la dispersión de nuevos viriones en el ambiente (Fornelos et al., 2015).

En el contexto de la dinámica poblacional, diversos estudios en la microbiota intestinal han reportado una mayor abundancia de bacteriófagos en comparación con las bacterias, con una relación aproximada de 10:1. Asimismo, se ha estimado que la concentración de partículas virales oscila entre 10^8 y 10^9 por gramo de heces (Marchi et al., 2023; Shkoporov y Hill, 2019). La relación bacteriófagos/bacterias y la dinámica poblacional en la que intervienen los bacteriófagos han cobrado relevancia en el contexto de la salud humana, debido a que se ha asociado el aumento en la diversidad de bacteriófagos con la disminución de la diversidad bacteriana en problemas inflamatorios a nivel intestinal, por otra parte también se ha propuesto el empleo de bacteriófagos para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas (fagoterapia) (De Sordi et al., 2019; Marchi et al., 2023; Norman et al., 2015).

Para comprender la dinámica entre bacteriófagos y bacterias, se han propuesto diversos modelos ecológicos, entre los que destaca el modelo presa-depredador. Este modelo describe la interacción entre dos poblaciones: una que actúa como presa, en este caso las bacterias, y otra que desempeña el papel de depredador, representada por los bacteriófagos. Su idea central es que el tamaño de ambas poblaciones cambia con el tiempo de forma interdependiente (Summers y Kreft, 2022). El tamaño de la población de presas (población bacteriana) se ve afectado por el tamaño de la población de depredadores (bacteriófagos); a su vez, el tamaño de la población de depredadores depende de la disponibilidad de presas. Estas interacciones determinan la dinámica de ambas poblaciones a lo largo del tiempo (Bisesi et al., 2024; Chevallereau et al., 2021; Egilmez et al., 2021). En este contexto, se describen, en primer lugar, los bacteriófagos denominados generalistas, caracterizados por su capacidad de infectar de manera indistinta a múltiples especies de bacterias, lo que puede ocasionar el declive simultáneo de diversas poblaciones bacterianas (Fernández et al., 2018; Bisesi et al., 2024). En segundo lugar, se identifican los bacteriófagos especialistas, los cuales se han adaptado a infectar grupos o géneros bacterianos específicos, afectando de manera selectiva a dichas poblaciones (Brockhurst et al., 2006). Este modelo también permite inferir las estrategias de sobrevivencia entre las poblaciones bacterianas, como es la competencia. En este contexto, la liberación de bacteriófagos especialistas, puede provocar el declive de poblaciones bacterianas específicas en un escenario de competencia, o bien la liberación de bacteriófagos generalistas que modulen o reduzcan distintas poblaciones bacterianas, lo que puede interpretarse como una forma de interacción tipo mutualista (Bisesi et al., 2024).

Otros modelos, como el propuesto por Marantos (2022), plantean que la depredación de bacterias por bacteriófagos limita el crecimiento poblacional de distintas especies bacterianas, de modo que el crecimiento bacteriano refleja el tamaño de la población de bacteriófagos. Este proceso permite que los nutrientes presentes en el ambiente permanezcan disponibles para poblaciones bacterianas con tasas de crecimiento lento. Este fenómeno, denominado "*matar al ganador*", favorece la coexistencia entre poblaciones de rápido y lento crecimiento, ya que, de lo contrario, las primeras agotan los nutrientes, afectando la supervivencia de las segundas. Este modelo integra elementos del enfoque presa-depredador y resalta el papel de la abundancia bacteriana como un factor clave en la dinámica de infección.

Dentro de la dinámica ecológica bacteriófagos-bacterias es importante considerar la participación de mecanismos de inducción y liberación de bacteriófagos, lo que provoca que poblaciones bacterianas susceptibles sean lisadas o entren en ciclos lisogénicos (León-Félix y Villicaña, 2021). Una de las formas en que se explica este fenómeno es a través de mediadores químicos producidos por las bacterias, los cuales pueden ser detectados por otras bacterias mediante mecanismos de *quorum sensing* (QS) (León-Félix y Villicaña, 2021). Si bien, este sistema permite a las bacterias monitorear el ambiente externo mediante compuestos químicos y activar mecanismos de supervivencia, alguno de estos mecanismos participan en la inducción de lisis bacteriana como los sistemas toxina

antitoxina, mecanismo por el cual puede iniciar la producción de ciclos líticos (Fernández-García et al., 2025).

Un ejemplo de esta interacción se ha observado en *E. coli*, donde la presencia de señales de N-acil-L-homoserina lactona (AHL), moléculas asociadas al QS, disminuyen la adsorción del bacteriófago lambda, reduciendo la infección. Esto es debido a que genera una regulación a la baja del receptor LamB, el cual es requerido para la unión de los bacteriófagos a la superficie celular. Esto genera un efecto de protección, lo cual evita la entrada para el bacteriófago lambda (Høyland-Kroghsbo et al., 2013).

Otros ejemplos incluyen la presencia de autoinductores, como el 5-dimetilpirazina-2-ol (DPO), en *Vibrio cholerae*, el cual se asocia con la densidad poblacional y la formación de biopelículas, pero también para el control de la lisis-lisogenia, dependiendo de la densidad celular y concentración del autoinductor en el medio extracelular (Silpe y Bassler, 2019). Asimismo, Erez y colaboradores (2017) observaron en *Bacillus subtilis* que bacteriófagos pertenecientes al grupo SP β pueden regular la decisión entre los ciclos lítico y lisogénico. Tras una infección previa, el material genético del bacteriófago induce la transcripción de un péptido codificado en su genoma, el cual es secretado al medio externo a través de la vía general de secreción (Sec). Posteriormente, este péptido es procesado por una proteasa, generando una forma madura denominada “arbitrium”. Durante este proceso ocurre la replicación de nuevos viriones y ciclos adicionales de infección, lo que incrementa la concentración de arbitrium en el medio. Una vez que esta molécula se acumula, es reconocida por un transportador de péptidos de *B. subtilis* e internalizada, donde se une al ADN del bacteriófago, bloqueando la transcripción del péptido, inhibiendo la formación de nuevos viriones y favoreciendo el establecimiento de la lisogenia.

Los mecanismos y la dinámica bacteriófagos–bacterias no son simples ni lineales, sino que involucran complejos sistemas de señalización y reconocimiento que modulan los eventos de lisis y lisogenia (Nanda et al., 2014). En la dinámica de inducción, infección y replicación de bacteriófagos intervienen factores ambientales, como el pH, el metabolismo bacteriano, la presencia de metabolitos secundarios, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de antibióticos en el medio (Maiques et al., 2006; Nanda et al., 2014; Selva et al., 2009). Estos últimos pueden interrumpir procesos celulares y generar daño en la pared o membrana celular, en los ácidos nucleicos o en la síntesis de proteínas, lo que desencadena respuestas de daño celular y activa mecanismos de inducción de bacteriófagos (Maiques et al., 2006).

Un ejemplo de un antibiótico capaz de inducir la transición de profago a bacteriófago es la ciprofloxacina, la cual provoca daño en el ADN bacteriano y activa la respuesta SOS. Este proceso desencadena mecanismos de reparación mediados por la proteína RecA, lo que favorece la inducción del ciclo lítico y, en consecuencia, la liberación de bacteriófagos (Zhang et al., 2000).

Estos factores ambientales influyen en la dinámica lisis–lisogenia, impactando la estructura poblacional de diversas bacterias. Así mismo afectando la evolución bacteriana, ya que durante el ciclo lisogénico puede transferirse nuevo material genético (Moura de Sousa et al., 2020). La THG, particularmente mediante la transducción mediada por bacteriófagos, permite la generación de poblaciones bacterianas resistentes a antibióticos, más virulentas o con mayores capacidades metabólicas, así como poblaciones con sistemas inmunitarios que limitan la infección por bacteriófagos (Alseth et al., 2023; Samson et al., 2013).

Adicionalmente, los bacteriófagos pueden contribuir con la evolución bacteriana mediante la eliminación de especies conjugantes, limitando con ello la THG mediada por plásmidos. Esto ocurre cuando poblaciones bacterianas receptoras de plásmidos, que sean susceptibles a la infección por bacteriófagos generalistas o especialistas, se ven reducidas, lo que disminuye la probabilidad de interacción con bacterias donadoras de plásmidos y, por

ende, reduce el número de eventos conjugativos. Por otro lado, durante los ciclos líticos, la liberación de material genético puede facilitar procesos de transformación bacteriana (Harrison et al., 2015).

Dentro de esta dinámica bacteriófagos–bacterias, se deben considerar dos aspectos fundamentales: (1) la capacidad de las bacterias para no ser infectadas por bacteriófagos y (2) la capacidad de los bacteriófagos para infectar bacterias. Se ha observado que la cercanía filogenética entre cepas del mismo género influye en la susceptibilidad o resistencia a la infección por una misma especie o género de bacteriófagos (Feltin et al., 2025).

En filogenética, la tendencia estadística de que las especies emparentadas compartan características debido a su historia evolutiva, en comparación con especies seleccionadas al azar, se conoce como señal filogenética (Münkemüller et al., 2012; Revell et al., 2008). Esta métrica se ha utilizado en la ecología de enfermedades para evaluar el rango de hospederos susceptibles de ser infectados por un mismo patógeno y determinar si la relación filogenética entre ellos influye en los patrones de infección. Un ejemplo de ello es el estudio de Perrin y colaboradores (2025), quienes analizaron murciélagos de diferentes especies y regiones geográficas, considerando además características individuales como la talla, el sexo y la masa corporal, con el objetivo de determinar la presencia de *Trypanosoma* spp. Mediante modelos lineales generalizados, los autores identificaron una asociación cofilogenética entre las especies de murciélagos y las variantes genéticas de *Trypanosoma* spp., lo que sugiere que la historia evolutiva compartida de ambos organismos influye en las interacciones hospedero-parásito.

En bacteriófagos también se ha demostrado la importancia de la señal filogenética en la determinación del rango de hospederos. Torres-Barceló y colaboradores (2025) observaron que los bacteriófagos generalistas son más propensos a ser reconocidos por los sistemas CRISPR-Cas de sus bacterias hospederas, dejando una huella genética que refleja su amplio rango de infección. Además, demostraron que la filogenia del hospedador constituye un factor determinante del grado de especialización de los bacteriófagos. En particular, encontraron que, a medida que aumenta la distancia filogenética entre las especies bacterianas, disminuye el número de hospederos susceptibles de ser infectados por un mismo bacteriófago.

De manera similar, Lara y colaboradores (2014) analizaron 89 cepas bacterianas aisladas del noreste del mar Mediterráneo, incluyendo 52 cepas de *Pseudoalteromonas* spp., 15 de *Alteromonas* spp., 3 de *Marinobacterium* spp., 8 de *Vibrio* spp., 3 de *Nereida* spp., 3 de *Erythrobacter* spp. y 5 pertenecientes al orden *Bacteroidaceae*. Sus resultados evidenciaron que algunos bacteriófagos poseen la capacidad de infectar múltiples especies bacterianas, mientras que otros presentan un elevado grado de especificidad hacia sus hospederos. A partir de las cepas de *Pseudoalteromonas* spp. se aislaron 25 bacteriófagos, los cuales infectaron preferentemente bacterias pertenecientes a géneros filogenéticamente cercanos, particularmente *Alteromonas* spp. Este hallazgo sugiere que la proximidad filogenética entre las especies bacterianas favorece la infección por un mismo bacteriófago. No obstante, los bacteriófagos generalistas mostraron un rango de infectividad altamente variable, mientras que los especialistas se limitaron a infectar una o dos cepas bacterianas. En conjunto, estos resultados evidencian la amplia diversidad funcional de los bacteriófagos y refuerzan la importancia de la relación filogenética entre los hospederos como un factor determinante para el éxito de la infección.

Por lo antes mencionado, dentro de la dinámica bacteriófago–bacteria, uno de los primeros requisitos es que el bacteriófago sea capaz de infectar a una bacteria hospedera (Bernheim y Sorek, 2019). Este proceso depende en gran medida, de la capacidad de la bacteria para defenderse de infecciones virales, ya que existen diversos mecanismos de defensa

bacteriana frente a la infección por bacteriófagos (Bernheim y Sorek, 2019; Mayo-Muñoz et al., 2024). Adicionalmente, como se mencionó previamente, otro elemento clave de esta dinámica que impulsa la evolución bacteriana es la capacidad de las bacterias para mantener, regular y expresar el nuevo material genético adquirido (Mirzaei y Maurice, 2017; Samson et al., 2013).

En el caso particular de *E. coli*, se ha descrito la presencia de bacteriófagos que han contribuido a la adquisición de diversos factores de virulencia, como *stx1a*, *stx2a*, *perC*, *espK*, *ltb* y *astA*, (Bonanno et al., 2015; Milani et al., 2023; Napit et al., 2024). En la actualidad, los bacteriófagos continúan participando activamente en la evolución de la patogenicidad de *E. coli* al transportar distintos genes de virulencia, lo que da lugar a la emergencia de nuevos patotipos (Bonanno et al., 2015).

Un ejemplo claro de este fenómeno es el patotipo *E. coli* enteroagregativo hemorrágico (EAHEC), responsable del brote entérico ocurrido en Alemania en 2011, el cual surgió a partir de la adquisición del bacteriófago “*Stx2-phage*” (Grande et al., 2014; Nyambe et al., 2017). Este evento evidenció la relevancia de los bacteriófagos en la generación de variantes patógenas de *E. coli* con un impacto significativo en la salud pública.

Los rumiantes, particularmente los bovinos, constituyen el principal reservorio natural de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157:H7, una de las principales causas de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos a nivel mundial (Karmali et al., 2010; Ferens y Hovde, 2011). Estos animales actúan como portadores asintomáticos debido a la ausencia de receptores vasculares (Gb3) para las shigatoxinas (Stx) en el endotelio de los rumiantes, lo que permite una colonización intestinal persistente sin manifestar enfermedad clínica (Pruimboom-Brees et al., 2000; Ferens y Hovde, 2011). La prevalencia de estas cepas en el ganado muestra variaciones estacionales significativas, siendo más alta durante los meses de verano en Escocia, y se ha identificado que ciertos animales denominados “superexcretadores” pueden eliminar altas cargas del patógeno al ambiente, actuando como focos críticos de contaminación de alimentos y fuentes hídricas (Chase-Topping et al., 2008; Ferens y Hovde, 2011).

La transmisión a humanos ocurre principalmente por ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal, destacando la importancia de las medidas de bioseguridad en la cadena productiva desde el campo hasta el consumidor (Karmali et al., 2010; Persad y Lejeune, 2014). Los bacteriófagos desempeñan un papel central en la virulencia de STEC, ya que los genes *stx*'s que codifican las shigatoxinas se encuentran en profagos lambdoides integrados en el cromosoma bacteriano (Pinto et al., 2020). La diversidad de sitios de inserción cromosómica de estos bacteriófagos portadores de *stx*'s permite diferenciar genotipos clínicos de aquellos predominantes en el reservorio bovino, observándose una mayor diversidad genotípica en aislados de origen bovino que en aquellos de origen humano (Shringi et al., 2012). Específicamente, los aislados bovinos suelen portar el subtipo *stx2c* asociado al sitio de inserción *sbcB*, mientras que los aislados clínicos presentan con mayor frecuencia *stx2a* asociado a los sitios *wrbA* o *argW* (Shringi et al., 2012).

En relación con la fauna silvestre, diversos estudios han documentado que las cepas de EHEC O157:H7 raramente se aíslan de los animales silvestres, con la excepción significativa de ciervos (*Cervus elaphus*), que pueden actuar como puentes epidemiológicos entre ambientes naturales y zonas de producción pecuaria (Ferens y Hovde, 2011; Kim et al., 2020). Asimismo, investigaciones recientes han identificado que especies como jabalíes (*Sus scrofa*), aves sinantrópicas y roedores pueden portar esporádicamente cepas patógenas, contribuyendo a la diseminación ambiental del microorganismo (Persad y Lejeune, 2014; Kim et al., 2020).

En un estudio realizado en el noreste de México, en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, se logró aislar un total de 61 cepas positivas a por lo menos un gen de virulencia asociado con los patotipos de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* productora de shigatoxinas (STEC), a partir de 55 carnívoros muestreados. Los resultados mostraron el aislamiento de 22 cepas STEC en un coyote (*Canis latrans*), 23 cepas de EPEC atípicas (EPECa) en una zorra del desierto (*Vulpes macrotis*), así como 13 cepas de EPECa y 3 cepas de STEC en un zorrillo encapuchado (*Mephitis macroura*). Además, se observó la presencia de filogrupos indeterminados en algunas de estas cepas. Estos hallazgos identifican a los carnívoros, y especialmente a los cánidos silvestres, como posibles reservorios de cepas STEC (López-Islas et al., 2022).

Además, en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, se han aislado cepas de *E. coli* asociadas con los patotipos EIEC, EPEC y STEC a partir de bisontes (*Bison bison*) silvestres. De manera similar a lo observado en las cepas recuperadas de carnívoros de esta región, algunas de estas cepas presentaron un filogrupo indeterminado. Asimismo, las cepas aisladas de bisontes mostraron perfiles de multirresistencia (López-Islas et al., 2024). En conjunto, estos estudios sugieren la posibilidad de que las cepas de *E. coli* presentes en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, puedan movilizarse entre distintas especies animales, lo cual tiene importancia en salud animal, debido a que es una reserva en la cual conviven especies silvestres con animales domésticos, resultado de la ganadería y los acuerdos para la conservación de la biodiversidad (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2012).

En 2010, se registró un brote multiestatal en Estados Unidos de *E. coli* O154:H28 (STEC), el cual tuvo su origen en el consumo de lechuga cultivada en el sur de Arizona. En este brote, se detectó la presencia de enterobacterias patógenas en lechugas, como *Salmonella* spp. y *E. coli* patógena, se relacionó con contaminación fecal proveniente de perros (*Canis lupus familiaris*) y coyotes. A partir de 358 muestras de heces de perros callejeros y 103 muestras de heces de coyotes, se aislaron 18 cepas de EPECa, de las cuales 13 provinieron de perros y 5 de coyotes. Asimismo, se aislaron 66 cepas de *Salmonella* spp., distribuidas equitativamente entre perros y coyotes (33 cepas en cada uno) (Jay-Russell et al., 2014).

Sin embargo, no se detectaron cepas STEC ni en perros ni en coyotes, por lo que estos animales no pudieron ser identificados como la fuente de contaminación de las lechugas. No obstante, los resultados sugieren que pueden comportarse como reservorios de enterobacterias con potencial patogénico en zonas agrícolas y ganaderas (Jay-Russell et al., 2014).

Kim y colaboradores (2020) señalan que algunas especies de animales de vida silvestre han sido identificadas como reservorios emergentes de *E. coli* productoras de shigatoxinas (STEC), ampliando el espectro de fuentes de infección más allá del ganado tradicional. Entre las especies de rumiantes silvestres que mencionan como reservorios de STEC están los bisontes. En bisontes se han detectado cepas de *E. coli* O157:H7, clásicamente descrita para humanos y bovinos, con prevalencias de 19.9%, detectadas en las uniones anorectales, mientras que su detección en heces es de 42.1% (Reinstein et al., 2007).

Estudios metagenómicos del rumen han revelado una amplia diversidad de secuencias asociadas a bacteriófagos, incluyendo genes relacionados con la replicación y empaquetamiento de bacteriófagos, principalmente asignados a los *phylum* Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria (Reddy et al., 2014). Específicamente, los bacteriófagos de ARN monocatenario de la clase Leviviricetes constituyen componentes dinámicos del viroma ruminal, mostrando patrones de replicación y depredación que sugieren interacciones presa-depredador con sus hospederos bacterianos. Estos fagos, que se unen a pili retráctiles en la superficie bacteriana, pueden interferir con la conjugación bacteriana y

potencialmente modular la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (Alexandersen et al., 2025).

Otro factor clave de la importancia de transferencia de material genético es la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (GRA), la cual representa un desafío crítico para la salud pública global. Muchos de estos GRA están en elementos genéticos móviles como los bacteriófagos y los plásmidos, los cuales son los principales vehículos de transferencia horizontal de estos GRA (Colavecchio et al., 2017; Torres-Barceló, 2018). Aunque tradicionalmente se consideraba que los bacteriófagos líticos no codifican GRA de manera habitual, su papel como vectores de transducción permiten movilizar accidentalmente ADN bacteriano, incluyendo plásmidos que portan determinantes de resistencia (Gomathinayagam et al., 2024). Estudios recientes han demostrado que los bacteriófagos lisogénicos pueden integrarse en el cromosoma bacteriano como profagos y portar GRAs, contribuyendo tanto a la transferencia vertical como horizontal (Lekunberri et al., 2017; Enault et al., 2017). En particular, análisis de viomas han identificado una alta abundancia de genes como *blaTEM*, *blaCTX-M* y *mecA* asociados a fracciones fágicas, lo que evidencia su papel como reservorios de resistencia (Lekunberri et al., 2017; Enault et al., 2017).

En la frontera entre plásmidos y bacteriófagos da lugar a los bacteriófagos tipo plásmidos (P-P), entidades extra-cromosómicas que tienen características de ambos elementos (Pfeifer y Rocha, 2024). Estas entidades pueden existir como plásmidos de ADN circular durante la fase lisogénica, replicándose de manera autónoma, pero bajo condiciones de estrés son capaces de empaquetarse en partículas fágicas infecciosas (Pfeifer y Rocha, 2024; Moura de Sousa et al., 2021). Esta dualidad les confiere una ventaja evolutiva significativa, ya que facilitan la propagación de la multiresistencia al combinar la estabilidad hereditaria de los plásmidos con la capacidad de transferencia horizontal mediada por bacteriófagos (Gomathinayagam et al., 2024; Pfeifer y Rocha, 2024).

Gomathinayagam y colaboradores (2024) señalan que, aunque los plásmidos típicamente codifican genes de resistencia y los bacteriófagos no contienen ARGs, los profagos con características plasmídicas son capaces de codificar y diseminar eficazmente genes que confieren resistencia a múltiples fármacos. Además, la presencia de estos elementos en ambientes acuáticos y en muestras de origen animal sugiere que el ambiente actúa como un reservorio significativo para la diseminación de ARGs mediada por bacteriófagos (Lekunberri et al., 2017; Colavecchio et al., 2017).

En ambientes ruminales se ha estudiado la presencia de GRA, estudios metagenómicos del material genético proveniente de ambiente ruminal de un Yack (*Bos mutus*), han demostrado la presencia de genes de resistencia, encontrando un total de 1,053 GRA entre ellos genes de resistencia a las tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglucósidos, carbamazepina, entre otros (Yang et al., 2025).

La interacción entre rumiantes domésticos, fauna silvestre y el entorno genera una red de relaciones ecológicas complejas que favorece la persistencia de cepas patógenas, así como la adquisición y diseminación de FV y GRA. Esta dinámica representa un desafío continuo para la salud pública, especialmente en regiones con alta densidad de producción ganadera (Persad y LeJeune, 2014; Kim et al., 2020). Estas interacciones ecológicas adquieren especial relevancia debido a que aproximadamente el 61 % de las Enfermedades infecciosas emergentes (EIDs) son zoonóticas y, de estas, el 71 % tienen su origen en la fauna silvestre. En este contexto, la interfaz entre fauna doméstica, fauna silvestre y humanos favorece la transmisión de agentes infecciosos entre diferentes especies, facilitando posteriormente su propagación hacia la población humana. Entre los patógenos identificados en esta interfaz se encuentran el virus de la influenza, *Brucella* spp., *E. coli* y *Salmonella* spp.

Uno de los principales factores que favorecen el salto de agentes infecciosos entre fauna silvestre, animales domésticos y humanos es la presencia de actividades ganaderas en áreas naturales. La transmisión de estas enfermedades está determinada por múltiples factores que abarcan desde escalas moleculares hasta escalas ecológicas (Sánchez et al., 2022).

Uno de los principales retos para la salud pública es la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos entre bacterias zoonóticas, lo que representa un riesgo significativo para la salud humana. Esta dispersión de genes de resistencia se ve favorecida tanto por la propagación de cepas multirresistentes como por la transferencia horizontal de genes (THG) entre bacterias presentes en fauna silvestre, animales domésticos y humanos (Vezeau et al., 2024).

Asimismo, se ha observado que la contaminación de suelos, agua y pastizales desempeña un papel importante en esta diseminación, ya que estos elementos forman parte de la cadena trófica de distintos animales, favoreciendo la transmisión de agentes infecciosos entre fauna silvestre, fauna doméstica y animales de producción como rumiantes (Vezeau et al., 2024).

No obstante, persiste una interrogante importante en relación con el ambiente ruminal. A pesar de que se han descrito diversos mecanismos mediante los cuales los bacteriófagos se inducen y transitan entre los ciclos líticos y lisogénico, aún no se comprende completamente cómo, en ambientes naturales —particularmente en microambientes complejos como el intestino o el rumen—, los bacteriófagos son estimulados para dirigir estos procesos. Esta dinámica podría favorecer la generación de nuevas variantes bacterianas potencialmente patógenas, especialmente en enterobacterias de relevancia en salud pública, como *E. coli*.

Considerando lo anterior, en este trabajo se propone investigar algunas de las bases que pueden conducir la evolución bacteriana a través del estudio de cepas patógenas de *E. coli* recuperadas de una región ecológica específica, en una escala temporal definida, pertenecientes a dos órdenes distintos. Nuestro grupo de investigación, entre 2013 y 2014, recuperó 136 cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV) a partir de muestras obtenidas de carnívoros y bisontes de la Reserva de la Biosfera de Janos (RBJ), en el estado de Chihuahua (López-Islas et al., 2022; López-Islas et al., 2024).

Estas cepas de *E. coli* PGV-RBJ fueron genotipificadas, identificándose genotipos asociados a *E. coli* enteropatógena atípica (aEPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y cepas portadoras de los genes *stx1*, *stx2*, *escV* y *eae*. La genotipificación se realizó bajo el esquema propuesto por Clermont y colaboradores (2013), demostrando que la mayoría de las cepas no se agrupan dentro de los filogrupos clásicos establecidos por dicha metodología. Asimismo, algunas cepas aisladas de los mismos individuos compartieron serogrupos, pero presentaron perfiles variables de factores de virulencia (FV), incluso dentro de un mismo hospedero, lo que sugiere que las cepas de *E. coli*, aún en un ambiente compartido, pueden estar sujetas a distintos procesos evolutivos.

Bajo esta premisa, nuestro grupo analizó 136 cepas de *E. coli* PGV mediante análisis de High Resolution Melting (HRM) de los genes *rpoD* y *rpoS*, los cuales codifican factores sigma, requerido para la transcripción de material genético, los cuales se asocian a la transcripción de factores de virulencia (Mittra et al., 2014). Los resultados mostraron que la adquisición de genes de virulencia sigue patrones específicos asociados a un fondo genético determinado (López-Islas, 2022). En conjunto, considerando la presencia de eventos ecológicos y evolutivos en la RBJ, se plantea que los bacteriófagos podrían participar activamente en los procesos evolutivos que dan origen a nuevas variantes de *E.*

coli con perfiles variables de factores de virulencia, generando cepas patógenas con potencial impacto en la salud pública.

En este estudio se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo participa el líquido ruminal, como componente del microambiente ruminal, en la inducción de bacteriófagos presentes en cepas de *E. coli* portadoras de FV y GRA?

Asimismo, ¿cómo podrían los bacteriófagos inducibles presentes en cepas de *E. coli* impactar en la diversidad genética de distintas cepas y en la posible transferencia horizontal de genes de resistencia antimicrobiana y de virulencia?

Hipótesis

1. Los bacteriófagos presentes en ambientes gastrointestinales contienen genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) y factores de virulencia (FV).
2. El líquido ruminal de bovinos induce la liberación de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV-RBJ y favorece la transición del ciclo lisogénico al lítico, lo que promueve la generación de variantes bacterianas potencialmente patógenas.
3. Las cepas de *Escherichia coli* PGV-RBJ liberan bacteriófagos atemperados que portan genes de virulencia, lo cual evidencia su participación en la transferencia horizontal de genes (THG) dentro de una misma región geográfica.

Objetivo general

Evaluar la presencia y participación de los bacteriófagos en la transferencia horizontal de genes (THG) de resistencia a los antimicrobianos y de virulencia en ambientes naturales, así como determinar el papel del microambiente ruminal en la inducción del ciclo lítico y las condiciones que favorecen la emergencia de nuevas variantes genéticas de microorganismos patógenos, con el fin de identificar el papel de los rumiantes en la evolución de enterobacterias de importancia en salud pública.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de bacteriófagos portadores de genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA) y factores de virulencia (FV) en el tracto gastrointestinal.
2. Evaluar la capacidad del líquido ruminal para inducir el ciclo lítico en cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV) recuperadas de fauna silvestre.
3. Establecer la dinámica ecológica presente en los bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV así como su participación en la transferencia horizontal de genes de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos.

Referencias Bibliográficas

Alexandersen, S., Polanco, I., Noel, S. J., Thorsteinsson, M., Kjeldsen, M. H., y Schönherz, A. A. (2025). The dynamics of single stranded, positive sense RNA bacteriophages in the rumen virome. *Scientific reports*, 15(1), 41435. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-26474-3>

- Aguirre-Sánchez, J. R., Valdez-Torres, J. B., Del Campo, N. C., Martínez-Urtaza, J., Del Campo, N. C., Lee, B. G., Quiñones, B., y Chaidez-Quiroz, C. (2022). Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation sources in Mexico. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 106, 105380. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105380>
- Alseth, E. O., Custodio, R., Sundius, S. A., Kuske, R. A., Brown, S. P., y Westra, E. R. (2024). The impact of phage and phage resistance on microbial community dynamics. *PLoS biology*, 22(4), e3002346. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002346>
- Bakhshinejad, B., y Ghiasvand, S. (2017). Bacteriophages in the human gut: Our fellow travelers throughout life and potential biomarkers of health or disease. *Virus research*, 240, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.013>
- Bernheim, A., y Sorek, R. (2019). The pan-immune system of bacteria: Antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>.
- Bisesi, A. T., Möbius, W., Nadell, C. D., Hansen, E. G., Bowden, S. D., y Harcombe, W. R. (2024). Bacteriophage specificity is impacted by interactions between bacteria. *mSystems*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.01177-23>.
- Borodovich, T., Shkoporov, A. N., Ross, R. P., y Hill, C. (2022). Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. *Gastroenterology report*, 10, goac012. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac012>
- Bohlin, J., Brynildsrud, O. B., Sekse, C., y Snipen, L. (2014). An evolutionary analysis of genome expansion and pathogenicity in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, 15(1), 882. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-882>.
- Bonanno, L., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Oswald, E., Garnier, L., Michel, V., y Auvray, F. (2015). Diversity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 Strains Examined via stx Subtypes and Insertion Sites of Stx and EspK Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3712–3721. <https://doi.org/10.1128/aem.00077-15>.
- Boyd, E. F., Davis, B. M., y Hochhut, B. (2001). Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends in microbiology*, 9(3), 137–144. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)01960-6](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)01960-6)
- Brockhurst, M. A., Fenton, A., Roulston, B., y Rainey, P. B. (2006). The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecology*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-19>.
- Chaudhuri, R. R., y Henderson, I. R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.005>
- Chase, J. M., y Myers, J. A. (2011). Disentangling the importance of ecological niches from stochastic processes across scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1576), 2351–2363. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0063>.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L. y Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature reviews. Microbiology*, 6(12), 904–912. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2029>

- Chevallereau, A., Pons, B. J., van Houte, S., y Westra, E. R. (2021). Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., y Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. y Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., y Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (2012). Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Janos. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/26_libro_pm.pdf
- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., y Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family - A Review. *Frontiers in microbiology*, 8, 1108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>
- Coura, F. M., de Araújo Diniz, S., Mussi, J. M. S., Silva, M. X., Lage, A. P., y Heinemann, M. B. (2017). Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia microbiologica*, 62(2), 139–144. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0480-9>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., y Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13>.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., y Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 19(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- De Sordi, L., Lourenço, M., y Debarbieux, L. (2019). The battle within: Interactions of bacteriophages and bacteria in the gastrointestinal tract. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.018>.
- Degnan, P. H., y Moran, N. A. (2008). Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6782–6791. <https://doi.org/10.1128/aem.01285-08>.
- Desroches, M., Royer, G., Roche, D., Mercier-Darty, M., Vallenet, D., Médigue, C., Bastard, K., Rodriguez, C., Clermont, O., Denamur, E., & Decousser, J. W. (2018). The Odyssey of the Ancestral *Escherichia coli* Strain through Culture Collections: an Example of Allopatric Diversification. *mSphere*, 3(1), e00553-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00553-17>
- Dobrindt, U., Chowdary, M. G., Krumbholz, G., y Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical microbiology and immunology*, 199(3), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0161-2>

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., Picard, B., y Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 6), 1671–1676. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1671>

Egilmez, H. I., Morozov, A. Yu., y Galyov, E. E. (2021). Modelling the spatiotemporal complexity of interactions between pathogenic bacteria and a phage with a temperature-dependent life cycle switch. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83773-1>.

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., y Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>.

Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguénec, C., y Denamur, E. (2004). A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>.

Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Rahimy, M. C., Andremont, A., Denamur, E., y Ruimy, R. (2004)a. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5698–5700. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004>

Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M. B., y Petit, M. A. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME journal*, 11(1), 237–247. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.90>

Feltin, C., Piry, S., Moury, B., Chateau, L., Berthier, K., Jacobs, J. M., Butchacas, J., Fenske, L., Ebeling-Koning, L., Smits, T. H. M., Morris, C. E., y Torres-Barceló, C. (2025). Ecological ubiquity and phylogeny drive nestedness in phages-bacteria networks and shape the bacterial defensome. *PLoS pathogens*, 21(12), e1013428. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1013428>.

Ferens, W. A., y Hovde, C. J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease*, 8(4), 465–487. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0673>

Fernández, L., Rodríguez, A., y García, P. (2018). Phage or foe: An insight into the impact of viral predation on microbial communities. *The ISME Journal*, 12(5), 1171–1179. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0049-5>.

Fernández-García, L., Blasco, L., Bleriot, I., Arman, L., Ibarguren-Quiles, C., Barrio-Pujante, A., de Aledo, M. G., García-Contreras, R., Cantón, R., Wood, T. K., y Tomas, M. (2025). Phages and quorum sensing: Findings to consider in phage therapy. *European Journal of Clinical Microbiology; Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-025-05375-3>.

Fornelos, N., Butala, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Bamford, J. K., y Salas, M. (2015). Bacteriophage GIL01 gp7 interacts with host LexA repressor to enhance DNA binding and inhibit RecA-mediated auto-cleavage. *Nucleic acids research*, 43(15), 7315–7329. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv634>

Fortier, L. C., y Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>

García-Gutiérrez, E., Almendros, C., Mojica, F. J. M., Guzmán, N. M., y García-Martínez, J. (2015). CRISPR Content Correlates with the Pathogenic Potential of *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, 10(7), e0131935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131935>.

Georjon, H., y Bernheim, A. (2023). The highly diverse antiphage defence systems of bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 21(10), 686–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00934-x>

Ghanbarpour, R., Sami, M., Salehi, M., y Ouromiei, M. (2011). Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 43(1), 153–157. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9667-2>.

Grande, L., Michelacci, V., Tozzoli, R., Ranieri, P., Maugliani, A., Caprioli, A., y Morabito, S. (2014). Whole genome sequence comparison of vtx2-converting phages from Enteroaggregative Haemorrhagic *Escherichia coli* strains. *BMC genomics*, 15(1), 574. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-574>

Gomathinayagam, S., y Kodiveri Muthukaliannan, G. (2025). Dynamics of antibiotic resistance genes in plasmids and bacteriophages. *Critical reviews in microbiology*, 51(2), 219–228. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2339262>

Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., y Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* gains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2484–2496. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>.

Hatfull G. F. (2015). Dark Matter of the Biosphere: The Amazing World of Bacteriophage Diversity. *Journal of virology*, 89(16), 8107–8110. <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-15>

Harrison, E., Wood, A. J., Dytham, C., Pitchford, J. W., Truman, J., Spiers, A., Paterson, S., y Brockhurst, M. A. (2015). Bacteriophages limit the existence conditions for conjugative plasmids. *mBio*, 6(3), e00586. <https://doi.org/10.1128/mBio.00586-15>

Høyland-Kroghsbo, N. M., Mærkedahl, R. B. y Svenningsen, S. L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.00362-12>.

Jajarmi, M., Askari Badouei, M., Imani Fooladi, A. A., Ghanbarpour, R., y Ahmadi, A. (2018). Pathogenic potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: Virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1407-2>.

Jajarmi, M., Imani Fooladi, A. A., Badouei, M. A., y Ahmadi, A. (2017). Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 109, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.041>.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Karmali, M. A., Gannon, V., y Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>

Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2025. PMID: 29630237.

- Kearney, M., Lieberman, B. S., y Strotz, L. C. (2024). Tangled banks, braided rivers, and complex hierarchies: beyond microevolution and macroevolution. *Journal of evolutionary biology*, 37(12), 1402–1412. <https://doi.org/10.1093/jeb/voae065>
- Kim, J. S., Lee, M. S., y Kim, J. H. (2020). Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00273>
- Klimenko, A. I., Matushkin, Y. G., Kolchanov, N. A., y Lashin, S. A. (2016). Bacteriophages affect evolution of bacterial communities in spatially distributed habitats: a simulation study. *BMC microbiology*, 16 Suppl 1(Suppl 1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0620-4>
- Leimbach, A., Hacker, J., y Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M., y Balcázar, J. L. (2017). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 220(Pt B), 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>
- Lenski R. E. (2017). Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *The ISME journal*, 11(10), 2181–2194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.69>
- León-Félix, J., y Villicaña, C. (2021). The impact of quorum sensing on the modulation of phage-host interactions. *Journal of Bacteriology*, 203 (11). <https://doi.org/10.1128/jb.00687-20>.
- Lin, Y., Zhou, B., y Zhu, W. (2021). Pathogenic *Escherichia coli*-Specific Bacteriophages and Polyvalent Bacteriophages in Piglet Guts with Increasing Coliphage Numbers after Weaning. *Applied and environmental microbiology*, 87(17), e0096621. <https://doi.org/10.1128/AEM.00966-21>
- Lindstedt, B. A., Finton, M. D., Porcellato, D., y Brandal, L. T. (2018). High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC infectious diseases*, 18(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3449-2>
- López-Islas, J. J., Méndez-Olvera, E. T., Martínez-Gómez, D., López-Pérez, A. M., Orozco, L., Suzan, G., y Eslava, C. (2022). Characterization of *Salmonella* spp. and *E. coli* Strains Isolated from Wild Carnivores in Janos Biosphere Reserve, Mexico. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(9), 1064. <https://doi.org/10.3390/ani12091064>
- López-Islas, J. J., Martínez-Gómez, D., Ortiz-López, W. E., Reyes-Cruz, T., López-Pérez, A. M., Eslava, C., & Méndez-Olvera, E. T. (2024). *Escherichia coli* Strains Isolated from American Bison (*Bison bison*) Showed Uncommon Virulent Gene Patterns and Antimicrobial Multi-Resistance. *Microorganisms*, 12(7), 1367. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071367>
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., y Xu, J. (2016). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of Marmota himalayana in Qinghai-Tibet plateau of China. *Emerging microbes & infections*, 5(12), e122. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.122>

- Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R. P., Barbé, J., y Penadés, J. R. (2006). β -Lactam Antibiotics Induce the SOS Response and Horizontal Transfer of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2726–2729. <https://doi.org/10.1128/jb.188.7.2726-2729.2006>
- Marantos, A., Mitarai, N., y Sneppen, K. (2022). From kill the winner to eliminate the winner in open phage-bacteria systems. *PLoS computational biology*, 18(8), e1010400. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010400>
- Marchi, J., Zborowsky, S., Debarbieux, L., y Weitz, J. S. (2023). The dynamic interplay of bacteriophage, bacteria and the mammalian host during phage therapy. *Science*, 26(2), 106004. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106004>.
- Mayo-Muñoz, D., Pinilla-Redondo, R., Camara-Wilpert, S., Birkholz, N., y Fineran, P. C. (2024). Inhibitors of bacterial immune systems: Discovery, mechanisms and applications. *Nature Reviews Genetics*, 25(4), 237–254. <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00676-9>.
- Milani, G., Belloso Daza, M. V., Cortimiglia, C., Bassi, D., y Coconcelli, P. S. (2023). Genome engineering of Stx1-and Stx2-converting bacteriophages unveils the virulence of the dairy isolate *Escherichia coli* O174:H2 Strain UC4224. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1156375>.
- Mitra, A., Fay, P. A., Vendura, K. W., Alla, Z., Carroll, R. K., Shaw, L. N., y Riordan, J. T. (2014). $\sigma(N)$ -dependent control of acid resistance and the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli* is activated by acetyl phosphate in a manner requiring flagellar regulator FlhDC and the $\sigma(S)$ antagonist FlhZ. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 497–512. <https://doi.org/10.1002/mbo3.183>
- Mirzaei, M. K., y Maurice, C. F. (2017). Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nature reviews. Microbiology*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>
- Moura de Sousa, J. A., Pfeifer, E., Touchon, M., y Rocha, E. P. C. (2021). Causes and Consequences of Bacteriophage Diversification via Genetic Exchanges across Lifestyles and Bacterial Taxa. *Molecular biology and evolution*, 38(6), 2497–2512. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab044>
- Münkemüller, T., Lavergne, S., Bzeznik, B., Dray, S., Jombart, T., Schiffrers, K., y Thuiller, W. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 743–756. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00196.x>.
- Nanda, A. M., Thormann, K., y Frunzke, J. (2014). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 410–419. <https://doi.org/10.1128/jb.02230-14>.
- Napit, R., Gurung, A., Poudel, A., Chaudhary, A., Manadhar, P., Sharma, A. N., Raut, S., Pradhan, S. M., Joshi, J., Poyet, M., Groussin, M., Rajbhandari, R. M., y Karmacharya, D. B. (2024). Metagenomic analysis of human, animal, and environmental samples identifies potential emerging pathogens, profiles antibiotic resistance genes, and reveals horizontal gene transfer dynamics. *Springer Science and Business Media LLC*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5133052/v1>.
- Nilsson, H., Cardoso-Palacios, C., Haggård-Ljungquist, E., y Nilsson, A. S. (2011). Phylogenetic structure and evolution of regulatory genes and integrases of P2-like phages. *Bacteriophage*, 1(4), 207–218. <https://doi.org/10.4161/bact.1.4.18470>.

- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldridge, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P. B., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., y Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>.
- Nyambe, S., Burgess, C., Whyte, P., y Bolton, D. (2017). An investigation of vtx2 bacteriophage transduction to different *Escherichia coli* patho-groups in food matrices and nutrient broth. *Food microbiology*, 68, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.004>
- Ochman, H., y Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of bacteriology*, 157(2), 690–693. <https://doi.org/10.1128/jb.157.2.690-693.1984>
- Patel, S. (2016). Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.030>.
- Perrin, A., Clément, L., Szentiványi, T., Théou, P., López-Baucells, A., Bonny, L., Scaravelli, D., Glaizot, O., & Christe, P. (2025). *Bat phylogeny and geographic location, rather than bat individual characteristics, explains the pattern of trypanosome infection in Europe. International Journal for Parasitology*, 55(13), 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2025.06.008>
- Persad, A. K., y LeJeune, J. T. (2014). Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 2(4),. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014>
- Pfeifer, E. y Rocha, E. P. C. (2024). Phage-plasmids promote recombination and emergence of phages and plasmids. *Nature communications*, 15(1), 1545. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45757-3>
- Pruimboom-Brees, I. M., Morgan, T. W., Ackermann, M. R., Nystrom, E. D., Samuel, J. E., Cornick, N. A. y Moon, H. W. (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10325–10329. <https://doi.org/10.1073/pnas.190329997>
- Reddy, B., Singh, K. M., Patel, A. K., Antony, A., Panchasara, H. J., y Joshi, C. G. (2014). Insights into resistome and stress responses genes in *Bubalus bubalis* rumen through metagenomic analysis. *Molecular biology reports*, 41(10), 6405–6417. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3521-y>
- Reinstein, S., Fox, J. T., Shi, X., Alam, M. J., y Nagaraja, T. G. (2007). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in the American bison (*Bison bison*). *Journal of food protection*, 70(11), 2555–2560. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.11.2555>
- Revell, L. J., Harmon, L. J. y Collar, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591–601. <https://doi.org/10.1080/10635150802302427>.
- Riley L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4), 10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>
- Rodriguez-Valera, F., Martín-Cuadrado, A.-B., Rodriguez-Brito, B., Pasic, L., Thingstad, T. F., Rohwer, F., y Mira, A. (2009). Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2009.3489.1>.

Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J. C., & de la Fe, C. (2022). En el principio fue la zoonosis: One Health para combatir esta y futuras pandemias. Informe SESPAS 2022 [In the beginning it was zoonosis: One Health to combat this and future pandemics. SESPAS Report 2022]. *Gaceta sanitaria*, 36 Suppl 1, S61–S67. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.01.012>

Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., y Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: Defeating bacterial defences. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 675–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3096>.

Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J. M., Lasa, Iñigo, Novick, R. P., y Penadés, J. R. (2009). Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1234–1238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809600106>.

Shkoporov, A. N., y Hill, C. (2019). Bacteriophages of the human gut: The “known unknown” of the microbiome. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>.

Silpe, J. E., y Bassler, B. L. (2019). A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision. *Cell*, 176(1–2), 268–280.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.059>.

Stephens, P. R., Altizer, S., Smith, K. F., Alonso Aguirre, A., Brown, J. H., Budischak, S. A., Byers, J. E., Dallas, T. A., Jonathan Davies, T., Drake, J. M., Ezenwa, V. O., Farrell, M. J., Gittleman, J. L., Han, B. A., Huang, S., Hutchinson, R. A., Johnson, P., Nunn, C. L., Onstad, D., Poulin, R. (2016). The macroecology of infectious diseases: A new perspective on global-scale drivers of pathogen distributions and impacts. *Ecology Letters*, 19(9), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/ele.12644>.

Summers, J. K., y Kreft, J. U. (2022). The role of mathematical modelling in understanding prokaryotic predation. *Frontiers in microbiology*, 13, 1037407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1037407>

Tayh, G., Boubaker, S. M., Ben Khedher, R., Jbeli, M., Ben Chehida, F., Mamlouk, A., Dâaloul-Jedidi, M., Messadi, L. (2022). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial profiles of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from healthy cattle in Tunisia. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 16(08), 1308–1316. <https://doi.org/10.3855/jidc.15855>.

Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M. E., Frapy, E., Garry, L., Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS genetics*, 5(1), e1000344. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>

Torres-Barceló C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 168. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>

Torres-Barceló, C., Boyer, C., Garneau, J. R., Poussier, S., Robène, I., & Moury, B. (2025). A phylogenetic host-range index reveals ecological constraints in phage specialisation and virulence. *Molecular Ecology*, 34(18), e70052. <https://doi.org/10.1111/mec.70052>

Tsuboi, M., Sztepanacz, J., De Lisle, S., Voje, K. L., Grabowski, M., Hopkins, M. J., Porto, A., Balk, M., Pontarp, M., Rossoni, D., Hildesheim, L. S., Horta-Lacueva, Q. J., Hohmann, N., Holstad, A., Lürig, M., Milocco, L., Nilén, S., Passarotto, A., Svensson, E. I., Villegas, C.,

y Houle, D. (2024). The paradox of predictability provides a bridge between micro- and macroevolution. *Journal of evolutionary biology*, 37(12), 1413–1432. <https://doi.org/10.1093/jeb/voae103>

Vezeau, N., y Kahn, L. (2024). Spread and mitigation of antimicrobial resistance at the wildlife-urban and wildlife-livestock interfaces. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 262(6), 741–747. <https://doi.org/10.2460/javma.24.02.0123>

Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Baño, J., Baquero, F., y Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>.

Yang, S., Chen, J., Zheng, J., Mao, H., Deng, F., Wu, D., y Chai, J. (2025). Feeding systems influence the rumen resistome in yaks by changing the microbiome. *Frontiers in microbiology*, 16, 1505938. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1505938>

Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., y Acheson, D. W. K. (2000). Quinolone antibiotics induce shiga toxin–encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 664–670. <https://doi.org/10.1086/315239>.

Capítulo Uno

Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos en contenido intestinal de un Coyote (*Canis latrans*)

Introducción

El incremento en la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa actualmente una de las crisis de salud pública más importantes del siglo XXI, ya que dificulta de manera significativa el tratamiento de enfermedades infecciosas de relevancia sanitaria (Miltgen et al., 2026). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. ha documentado un aumento en la mortalidad asociada a infecciones bacterianas, incluidas aquellas que previamente se encontraban bajo control, debido a la emergencia de patógenos multirresistentes (MDR) (Murray et al., 2022). Se estima que, para el año 2050, las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes podrían ocasionar hasta 10 millones de muertes anuales a nivel mundial (Cross et al., 2026). Además, la RAM incrementa la duración de las estancias hospitalarias, alcanzando hasta 11.65 días adicionales por paciente, y prolonga los tratamientos terapéuticos, lo que se traduce en un aumento considerable de los costos para los sistemas de salud pública (Stewardson et al., 2016). Esta crisis sanitaria es consecuencia de la emergencia y reemergencia de agentes patógenos multirresistentes, entre los que destacan *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus* spp., entre otros. En este sentido, desde 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró emergencia global debido al aumento de las infecciones multirresistentes, atribuido principalmente al uso indiscriminado e inadecuado de antibióticos. La OMS advierte incluso que nos encontramos ante una crisis que podría conducir a una era postantibiótica, caracterizada por el riesgo de brotes epidémicos de infecciones bacterianas para las cuales los tratamientos antimicrobianos resulten insuficientes (Murray et al., 2022; Stewardson et al., 2016).

Una de las principales causas atribuidas al incremento de la multirresistencia en diversos patógenos es el uso excesivo e inapropiado de antibióticos, lo cual ha generado una intensa presión de selección que favorece la proliferación de microorganismos con resistencia natural. Bajo este fenómeno, los microorganismos capaces de sobrevivir a los tratamientos antimicrobianos incrementan su frecuencia poblacional después de tratamientos clínicos, mientras que las poblaciones susceptibles se reducen significativamente (Michaelis et al., 2023).

No obstante, la RAM no se explica únicamente por la selección natural inducida por el uso de antibióticos. Uno de los mecanismos clave en la diseminación de genes de resistencia es la transferencia horizontal de genes (THG), mediante la cual los microorganismos pueden adquirir genes de resistencia provenientes de otros microorganismos (von Wintersdorff et al., 2016; Vinayamohan et al., 2022).

Sin embargo, la simple adquisición de genes de resistencia no explica por sí sola la diversificación de los mecanismos de resistencia observados en las bacterias, como ocurre en el caso de los betalactámicos (Fröhlich et al., 2021). Esta diversificación es el resultado de múltiples mecanismos evolutivos, entre ellos la presencia de genes ortólogos, duplicaciones génicas, cambios estructurales, mutaciones puntuales y modificaciones en la función enzimática (Fröhlich et al., 2021).

Como ya se ha mencionado, la THG constituye uno de los principales mecanismos evolutivos de las bacterias, permitiéndoles adquirir y diseminar rápidamente genes, incluidos aquellos asociados a la resistencia antimicrobiana (GRAs) (von Wintersdorff et al., 2016). La THG puede ocurrir entre bacterias de distintos géneros, facilitando la dispersión de genes de resistencia en comunidades microbianas y acelerando la adaptación bacteriana

frente a la presión selectiva ejercida por los antibióticos (Arber, 2000). Los mecanismos canónicos de la THG incluyen: transformación, que implica la captación de ADN libre presente en el ambiente extracelular; conjugación, que requiere contacto directo entre bacterias mediante estructuras especializadas como las fimbrias o el sistema de secreción tipo IV, y permite la transferencia de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones; y transducción, que consiste en la transferencia de ADN mediada por bacteriófagos (Partridge et al., 2018).

Un ejemplo de lo anterior es lo observado por Li y colaboradores (2025), quienes reportan la presencia de un plásmido denominado pNDM KPC (portador de los genes *bla*_{KPC-2} y *bla*_{NDM-1}) con una alta eficiencia de conjugación. Dicha capacidad fue demostrada mediante la inducción de la conjugación entre la cepa donadora (*Citrobacter freundii*) y una cepa receptora (*E. coli* J53), integrando a la secuencia IS26 apoyado del integrón *Int1*, en el plásmido pNDM KPC. Como resultado, se observó un efecto sinérgico frente a antimicrobianos como aztreonam en combinación con ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam e imipenem/relebactam. Estos hallazgos sugieren que la multiresistencia en la cepa donadora es mediante la THG.

Otro ejemplo relevante es el gen *mcr-1*, responsable de la resistencia a polimixina, el cual se encuentra ampliamente distribuido entre diversas bacterias y se asocia principalmente a eventos de conjugación (Liu et al., 2016).

Aunque la conjugación ha sido ampliamente estudiada, la transducción mediada por bacteriófagos ha sido históricamente subestimada en su contribución a la diseminación de la RAM. Por ello, el papel de la transducción en la transferencia de GRA permanece en debate y requiere mayor investigación, particularmente en la relación con la contribución de los bacteriófagos a la adquisición de estos genes y a la generación de cepas multirresistentes (Borodovich et al., 2022; Brown-Jaque et al., 2015).

Sin embargo, existe evidencia que indica que los bacteriófagos actúan como vectores eficientes de GRAs, además de genes de virulencia, influyendo de manera significativa en la evolución de patógenos de importancia en salud pública (Balcazar, 2014). Esto se debe a que, durante el ciclo lítico, un bacteriófago puede empaquetar accidentalmente fragmentos del genoma bacteriano del hospedero en lugar de su propio material genético. Entre el material genético que puede ser empaquetado se incluyen genes de resistencia a antimicrobianos (Haaber et al., 2016). Una vez empaquetado este material genético y formados los nuevos viriones, estos son liberados al medio mediante lisis, iniciando nuevos ciclos de infección en los que puede ocurrir la transducción. Este proceso puede presentarse de dos formas: transducción generalizada y transducción especializada. La transducción generalizada ocurre cuando fragmentos aleatorios del ADN bacteriano son empaquetados, mientras que la transducción especializada implica la transferencia de genes adyacentes al sitio de integración de un bacteriófago atemperado (profago) durante su escisión del genoma bacteriano al pasar del ciclo lisogénico al ciclo lítico (Haaber et al., 2016).

Para que ocurra el proceso de transducción, tras la inyección del nuevo material genético, los bacteriófagos “transductores” deben ser capaces de recombinarse con el genoma del nuevo hospedero, siempre que existen regiones de homología. Este es el caso de *Staphylococcus aureus*, donde se ha observado que los sitios de inserción son sitios de recombinación, generando una transducción especializada (Bowring et al., 2022). Así mismo, se observó que *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) adquirió el gen *mecA* integrado en el *cassette* cromosomal SCCmec, mediante elementos genéticos móviles con afinidad por sitios específicos del cromosoma bacteriano (Kayatama et al., 2000).

Además, se han descrito entidades tipo bacteriófago, como partículas virales y vesículas, que contienen fragmentos de ADN asociados a bacteriófagos y a células hospedadoras,

pero que por sí solas son incapaces de llevar a cabo la transducción. A estas entidades tipo bacteriófagos se les conoce como agentes de transferencia génica (GTA), que también pueden facilitar el intercambio genético (Lang et al., 2012). La eficiencia de la transducción depende de factores como la especificidad del hospedero, la abundancia de bacteriófagos y la densidad bacteriana (Balcazar, 2014).

Diversos estudios han propuesto el papel de los bacteriófagos en la transferencia de genes de resistencia en patógenos de relevancia en salud pública. Un ejemplo de ello se ha documentado en *Staphylococcus* spp., donde se ha descrito la asociación entre un profago y el gen *erm* (eritromicina ribosomal metilasa), el cual confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B. Este fenómeno fue reportado en cepas de *Staphylococcus xylosus*, en las que, mediante análisis de secuenciación, se identificó el gen *erm* integrado en el profago Φ JW4341. Posteriormente, ensayos experimentales de conjugación y electrot transformación realizados en cepas de *Staphylococcus aureus* JW4341 no lograron evidenciar la transferencia del gen *erm*, lo que sugiere que su movilización ocurre principalmente a través de mecanismos de transducción (Wipf et al., 2014).

Otro ejemplo es la transferencia experimental de resistencia a eritromicina y tetraciclina, observada en cepas de *Staphylococcus aureus* mediada por el profago Φ 11, lo que pone de manifiesto el papel de los bacteriófagos en la emergencia de nuevos linajes resistentes a los antibióticos. Haaber y colaboradores (2016) demostraron que el profago Φ 11 induce un evento de autotransducción dependiente del sistema RecA-CI, pero independiente de la respuesta SOS, y que su sola presencia es suficiente para promover este mecanismo tanto in vitro como in vivo.

En ambientes hospitalarios se ha detectado la presencia de partículas fágicas portadoras de genes de resistencia como *tet* (gen de resistencia a tetraciclinas), *erm*, *bla* a betalactámicos, entre otros, encontrando 215 bacteriófagos que portan en sus genomas GRA, en total 16 tipos de GRA y 108 subtipos identificados, lo que podría facilitar la diseminación de la resistencia antimicrobiana en hospitales (Kang et al., 2024). En bacterias gramnegativas como *E. coli* y *K. pneumoniae*, recuperadas de efluentes hospitalarios, se han detectado bacteriófagos portadores de genes de betalactamasas de espectro extendido como *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, y *bla*_{CTX-M}, mostrando la contribución de los bacteriófagos en la adquisición de genes de resistencia a betalactámicos de espectro extendido (Mahdavi et al., 2022).

Dentro de la dinámica de la THG de resistencia, el microbioma intestinal constituye un entorno crítico para el intercambio de genes de resistencia, ya que alberga una comunidad diversa de bacteriófagos, conocida como fagoma, el cual permite el intercambio de genes (Hu et al., 2024). Esta situación también se ha observado en el ambiente intestinal de los cerdos. En un estudio realizado con bacteriófagos intestinales de 112 cerdos, se analizaron las características compartidas entre las comunidades de bacteriófagos, así como los genes potencialmente distribuidos en el fagoma intestinal. Los resultados mostraron la presencia de un total de 241 genes de GRA asociados con los bacteriófagos del fagoma intestinal de los cerdos (Hu et al., 2024). Estudios metagenómicos en humanos y animales han identificado 25 clases y 53 subtipos de ARGs en bacteriófagos, incluidos genes asociados a resistencia a tetraciclinas, betalactámicos, sulfonamidas, entre otros (Napit et al., 2025). De acuerdo con lo mencionado, el fagoma intestinal podría actuar como un reservorio genético que facilita la transferencia de ARGs (Napit et al., 2025).

Un análisis metagenómico de 33 viomas de distintos hábitats —incluyendo heces de animales y humanos, aguas residuales, aguas limpias y ambientes marinos— muestra la presencia de GRA. Además, se encontró bacteriófagos que en su genoma contenían secuencias de GRA (Calero-Cáceres et al., 2014). De manera similar, en lodos resultantes del tratamiento de aguas residuales se han encontrado GRA asociado a bacteriófagos (Lekunberri et al., 2017).

Según Yu y colaboradores (2024), los bacteriófagos más abundantes en el intestino humano son los Caudovirales, que pueden movilizar ADN bacteriano mediante mecanismos como la transducción especializada, contribuyendo significativamente a la diseminación de GRA. El microbioma intestinal actúa como un ecosistema dinámico donde la diseminación de GRA se ve facilitada por los bacteriófagos a través de la transducción, además de permitir dinámicas ecológicas, como de presa depredador, dinámica de reina roja y matando al ganador (Kirsch et al., 2021).

Paralelamente, la fauna silvestre actúa como un reservorio crucial y un vehículo de diseminación de estos genes en el medio ambiente. Gharbi y colaboradores (2026) señalan que animales, especialmente aves migratorias, portan cepas con determinantes de resistencia (como los genes *gyrA* y *tet(O)*), y su movilidad permite la propagación geográfica de estos elementos. Este fenómeno se ve intensificado por la interfaz con ecosistemas antropizados; por ejemplo, Zhao y colaboradores (2024) demostraron que la presencia de ganado en pastoreo modifica la microbiota de especies silvestres simpátricas, enriqueciendo la abundancia de genes de resistencia (como *MCR* y *vat*) y elementos genéticos móviles, lo que subraya el riesgo de transferencia horizontal mediada por fagos en la interfaz humano-animal.

Según Calvo-Fernández y colaboradores (2025), las interacciones ecológicas entre humanos y fauna silvestre moldean el resistoma, entendido como la totalidad de genes y mecanismos genéticos que confieren a las bacterias la capacidad de resistir los efectos de los antibióticos. Este fenómeno fue evaluado en dos especies de perezosos de Costa Rica: el perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y el perezoso de tres dedos (*Bradypus variegatus*).

La primera especie presenta mayor movilidad y una dieta más amplia, mientras que la segunda posee menor movilidad y una dieta más especializada. Los resultados mostraron perfiles de resistoma distintos entre ambas especies. *Choloepus hoffmanni* presentó resistencia a sulfametoxazol, tetraciclinas, cloranfenicol, ampicilina, trimetoprima y ciprofloxacino, mientras que *Bradypus variegatus* únicamente mostró resistencia a sulfametoxazol.

Además, en *Choloepus hoffmanni* se detectó la presencia de genes de resistencia como *tet(A)*, *tet(B)*, *blaTEM-1B*, *aph(3'')-Id*, *aph(6)-Id*, *sul2*, *qnrS1*, *floR* y *dfrA8*. Los autores observaron que esta especie habita más cerca de áreas antropogénicas, mientras que *Bradypus variegatus* se encuentra en regiones más alejadas de la actividad humana, mostrando una correlación entre la presencia de genes de resistencia y la proximidad a asentamientos humanos.

En este contexto, la cercanía a ambientes modificados por el ser humano puede influir en la diseminación de cepas de *E. coli* portadoras de genes de resistencia antimicrobiana (GRA). Para demostrarlo, los autores analizaron 37 cepas de *E. coli*, en las cuales identificaron 47 GRA distribuidos entre las distintas cepas, destacando genes asociados con bombas de expulsión, elementos regulatorios y betalactamasas (Calvo-Fernández et al., 2025).

De manera similar, Wen y colaboradores (2025) demostraron que las ratas silvestres (*Rattus* spp.) en áreas urbanas y granjas de Hong Kong albergan una alta diversidad de GRA (incluyendo *tetM*, *floR* y *mecR1*) y bacterias zoonóticas resistentes, entre las cuales se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, y *Staphylococcus aureus*. En estos roedores se reportó una abundancia del 26.61% para tetraciclinas, 12.67% para rifampicina y un 10.69%, especialmente en individuos provenientes de entornos agrícolas, lo que subraya el papel de estos roedores como vectores de diseminación desde fuentes antropogénicas hacia el ambiente natural.

En este escenario, Duman y colaboradores (2025) identificaron que incluso especies en cautiverio o ambientes acuáticos, como peces ornamentales, pueden portar cepas silvestres con perfiles de resistencia, lo que indica que la adquisición de GRA desde el ambiente ocurre en diversos taxones y ecosistemas. Lund y colaboradores (2025) señalan que la compatibilidad genética y la conectividad ecológica, particularmente en ambientes como aguas residuales y el microbioma humano, son factores determinantes en la transferencia horizontal exitosa de GRA entre bacterias, evidenciando que la fauna silvestre que comparte estos nichos ecológicos actúa como un eslabón clave en la diseminación ambiental de la resistencia antimicrobiana bajo el enfoque de "Una Sola Salud".

Comprender en profundidad la dinámica, ecología y los factores que regulan la transducción mediada por bacteriófagos, así como su impacto en la adquisición de ARGs es clave para el desarrollo de estrategias integrales de vigilancia epidemiológica, la evaluación de riesgos asociados a terapias basadas en bacteriófagos (fagoterapia) y el diseño de intervenciones innovadoras que permitan interferir con esta vía de diseminación genética (Argov et al., 2017; de Jonge et al., 2019). En este marco, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la diversidad de bacteriófagos en el ambiente intestinal de un coyote de vida libre, así como identificar ARGs asociados al fagoma intestinal, con el fin de contribuir al entendimiento del papel de los bacteriófagos en la diseminación de la resistencia antimicrobiana en ambientes naturales.

Identification of antimicrobial resistance genes in intestinal content from Coyote (*Canis latrans*)

J.J. López-Islas¹, E.T. Méndez-Olvera², T. Reyes C², D. Martínez-Gómez²

¹Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Autonomous Metropolitan University (UAM), Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, C.P. 04960, Coyoacán, México City, México ²Department of Agricultural and Animal Production, Autonomous Metropolitan University, campus Xochimilco (UAM-X), Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, C.P. 04960, Coyoacán, México City, México

Abstract

Antibiotic resistance has become a global public health concern in the last few years. Given the widespread rate of recurrence, increasing attention is being turned toward environmental pathways that potentially contribute to antibiotic resistance genes (ARGs) dissemination outside the clinical realm. In this study, a metagenome analysis of intestinal virus-like particle fraction (VLPs) from a wild coyote (*Canis latrans*) revealed for the first time, multiple ARGs, such as B-lactamases and multidrug efflux pumps. Description of ARGs presence in natural environments is critical to understand the emergence of resistant strains.

Key words: antimicrobial resistance, metagenome, *Canis latrans*

Correspondence to: D. Martínez-Gómez, e-mail: dmartinez@correo.xoc.uam.mx

Table 1. Antibiotic resistance genes identified in virus like particles (VLPs)*

Gene	Identity (%)	Function
<i>mdtABC</i>	81.4	The MdtABC tripartite complex confers resistance against novobiocin and deoxycholate.
<i>pmrF</i>	79.66	Required for Lipid A modification to resist the antimicrobial activity of antibiotics such as polymyxin
<i>mexK</i>	81.3	MexK system effluxed tetracycline and erythromycin together with outer membrane protein channel OprM.
<i>ampH</i>	81.35	Class D β -lactamases <i>E. coli</i> .
<i>bla</i> _{CMY-104}	85.78	Serine beta-lactamase with a substrate specificity for cephalosporins
<i>bla</i> _{CMY-59}	85.02	AmpC type beta-lactamase
<i>bla</i> _{CMY-157}	86.47	Class C beta-lactamase CMY-157
<i>acrAB</i>	86.41	AcrAB-TolC is Major multidrug efflux pump in <i>E. coli</i> .
<i>acrD</i>	81.05	Aminoglycoside efflux pump component.
<i>mdfA</i>	76.66	MdfA is a multidrug/proton antiporter with a remarkably broad substrate specificity profile
<i>acrEF</i>	77.89	Tripartite efflux system (AcrEF-TolC) involved in the efflux of indole and organic solvents
<i>mexEF- oprN</i>	89.08	MexEF is the multidrug inner membrane transporter of the MexEF-OprN multidrug efflux complex.
<i>msbA</i>	83.13	MsbA is a multidrug resistance transporter that belongs to a superfamily of transporters.
<i>mdtK</i>	78.08	Multidrug efflux pump, that confers resistance to norfloxacin, ciprofloxacin, doxorubicin, trimethoprim, chloramphenicol and fosfomycin.
<i>kpnEF</i>	76.34	Mutation in KpnEF resulted in increased susceptibility to cefepime ceftriaxon colistin erythromycin rifampin tetracycline and streptomycin.
<i>mdtGH</i>	79.16	Multidrug resistance system that confers resistance to norfloxacin and enoxacin.
<i>catB4</i>	100	Chloramphenicol acetyltransferase

* ARGs identification was completed used the most well-known ARGs databases (Papp et al. 2022)

Introduction

Metagenomic analyses have been used to estimate the incidence of ARGs in different antibiotic-contaminated and natural ecosystems (Li et al. 2020). Metagenomic analysis of hospital wastewater revealed ARGs in bacteriophages, showing the significant role of these agents as reservoirs and dissemination vehicles (Subirats et al. 2016). ARGs have been also reported inside of prophages, inside of clinical *E. coli* strains genomes (Schroeder et al. 2002). These data suggests that lateral transfer of ARGs by phage-mediated transduction could be an important contributing factor in the global spread of antibiotic resistance. The contribution of bacteriophages to the maintenance and spread of ARGs has been broad described in antibiotic contaminated ecosystems. However, in other environments this analysis has not been realized. In this pilot study, metagenomic analyses of VLPs recuperated from intestinal content from coyote (*Canis latrans*) were performed, showing the presence of diverse ARGs.

Materials and Methods

Samples

Three samples of intestinal content from recently deceased coyote, found in Janos Biosphere Reserve, Chihuahua, Mexico, during routine inspection. The samples were collected directly from intestine, placed in sterile plastic containers, and frozen until processing.

Metagenome analysis of Virus-Like Particles (VLPs)

DNA from VLPs was isolated using a protocol described by Summer (2009). The DNA samples were sequenced on a high-throughput DNA sequencer system (Illumina HiSeq™ 2000, San Diego, CA). Low-quality reads were filtered, and contiguous sequences were assembled using the online software metaSPAdes (Nurk et al. 2017). ARGs identification was performed with the Abricate software version 1.0.1., using the databases: AMRFinderPlus, CARD, Resfinder, ARG-ANNOT, and Plasmid-Finder (Papp et al. 2022). ViromeQC was used to quantify non-viral contamination (Zolfo et al. 2019).

Supplementary table 1. Antibiotic resistance genes identified in virus like particles (VLPs)*

	SEQUENCE	GENE	IDENTITY (%)	ACCESSION	PRODUCT
1	NODE_02	<i>mdtA</i>	77.18	U00096:2154015-2155263	MdtA is the membrane fusion protein of the multi-drug efflux complex mdtABC.
2	NODE_02	<i>mdtB</i>	81.4	U00096:2155262-2158385	MdtB is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtC to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-TolC efflux complex.
3	NODE_02	<i>mdtC</i>	81.08	U00096:2158385-2161463	MdtC is a transporter that forms a heteromultimer complex with MdtB to form a multidrug transporter. MdtBC is part of the MdtABC-TolC efflux complex. In the absence of MdtB MdtC can form a homomultimer complex that results in a functioning efflux complex with a narrower drug specificity. mdtC corresponds to 3 loci in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (gene name: muxC/muxB) and 3 loci in <i>P. aeruginosa</i> LESB58.
4	NODE_02	<i>baeS</i>	80.57	AP009048:2165012-2166416	BaeS is a sensor kinase in the BaeSR regulatory system. While it phosphorylates BaeR to increase its activity BaeS is not necessary for overexpressed BaeR to confer resistance.
5	NODE_02	<i>baeR</i>	82.7	AP009048.1:2166412-2167135	BaeR is a response regulator that promotes the expression of MdtABC and AcrD efflux complexes.
6	NODE_02	<i>yojL</i>	80.26	U00096.3:2308615-2306971	YojL mediates resistance to the peptide antibiotic microcin J25 when it is expressed from a multicopy vector. YojL can pump out microcin molecules. The outer membrane protein TolC in addition to YojL is required for export of microcin J25 out of the cell. Microcin J25 is thus the first known substrate for YojL.
7	NODE_02	<i>pmrF</i>	79.66	U00096:2367070-2368039	PmrF is required for the synthesis and transfer of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) to Lipid A which allows gram-negative bacteria to resist the antimicrobial activity of cationic antimicrobial peptides and antibiotics such as polymyxin. <i>pmrF</i> corresponds to 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and 1 locus in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.
8	NODE_04	<i>mdtM</i>	79.1	U00096.3:4568519-4567286	Multidrug resistance protein MdtM
9	NODE_07	<i>mexK</i>	81.3	AE004091.2:4119265-4116187	MexK is the inner membrane resistance-nodulation-cell division (RND) transporter in the MexJK multidrug efflux protein.
10	NODE_104	<i>mexW</i>	82.6	NC_002516.2:4904646-4907703	MexW is the RND-type membrane protein of the efflux complex MexVW-OprM.
11	NODE_115	<i>opmH</i>	77.58	AE004091.2:5584100-5585549	OpmH is an outer membrane efflux protein required for triclosan-specific efflux pump function.
12	NODE_116	<i>rpoB2</i>	76.19	AP006618.1:4835199-4838688	Due to gene duplication the genomes of <i>Nocardia</i> species include both rifampin-sensitive beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB</i>) and rifampin-resistant beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB2</i>) genes with ~88% similarity between the two gene products. Expression of the <i>rpoB2</i> variant results in replacement of rifampin sensitivity with rifampin resistance.
13	NODE_117	<i>emrR</i>	86.25	U00096.3:2810769-2811300	EmrR is a negative regulator for the EmrAB-TolC multidrug efflux pump in <i>E. coli</i> . Mutations in this gene lead to EmrAB-TolC overexpression.
14	NODE_117	<i>emrA</i>	81.6	AP009048:2810082-2811255	EmrA is a membrane fusion protein providing an efflux pathway with EmrB and TolC between the inner and outer membranes of <i>E. coli</i> a Gram-negative bacterium.
15	NODE_117	<i>emrB</i>	84.92	U00096:2812615-2814154	EmrB is a translocase in the EmrB-TolC efflux protein in <i>E. coli</i> . It recognizes substrates including carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) nalidixic acid and thioactomycin.

cont. Supplementary table 1. Antibiotic resistance genes identified in virus like particles (VLPs)*

15	NODE_117	<i>emrB</i>	84.92	U00096:2812615-2814154	EmrB is a translocase in the EmrB-TolC efflux protein in <i>E. coli</i> . It recognizes substrates including carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) nalidixic acid and thiooctomycin.
16	NODE_13	<i>sdiA</i>	76.14	AE006468.2:2040377-2039654	SdiA is a cell division regulator that is also a positive regulator of AcrAB only when it's expressed from a plasmid. When the <i>sdiA</i> gene is on the chromosome it has no effect on expression of <i>acrAB</i> .
17	NODE_13	<i>emrE</i>	76.42	Z11877.1:485-818	Member of the small MDR (multidrug resistance) family of transporters; in <i>E. coli</i> this protein provides resistance against several positively charged compounds including ethidium bromide and erythromycin; proton-dependent secondary transporter which exchanges protons for compound translocation
18	NODE_14	<i>bacA</i>	82.15	U00096.3:3204131-3203309	The <i>bacA</i> gene product (BacA) recycles undecaprenyl pyrophosphate during cell wall biosynthesis which confers resistance to bacitracin.
19	NODE_14	<i>tolC</i>	82.83	FJ768952:0-1488	TolC is a protein subunit of many multidrug efflux complexes in Gram negative bacteria. It is an outer membrane efflux protein and is constitutively open. Regulation of efflux activity is often at its periplasmic entrance by other components of the efflux complex.
20	NODE_142	<i>blaCMY-104</i>	85.78	KF150216:1-1146	BlaCMY-104 is a beta-lactamase
21	NODE_142	<i>blaCMY-59</i>	85.02	AB587082:0-1188	BlaCMY-59 is a beta-lactamase found in <i>Shigella</i> spp.
22	NODE_142	<i>blaCMY-157</i>	86.47	NG_055587.1	BlaCMY157 is a class C beta-lactamase
23	NODE_142	<i>blaCMY-104-1</i>	85.78	KF150216	BlaCMY-104 is a beta-lactamase
24	NODE_1420	<i>catB4</i>	100	EU935739:59054-59602	CatB4 is a chloramphenicol acetyltransferase.
25	NODE_156	<i>mdtG</i>	77.38	CP000800.1:1192954-1191727	The MdtG protein also named YceE appears to be a member of the major facilitator superfamily of transporters, and it has been reported when overexpressed to increase fosfomycin and deoxycholate resistances. <i>mdtG</i> is a member of the <i>marA</i> - <i>soxS</i> - <i>rob</i> regulon.
26	NODE_156	<i>mdtH</i>	79.16	U00096:1125326-1124117	Multidrug resistance protein MdtH
27	NODE_18	(Bla) <i>ampH</i>	81.35	AP012030:395554-396711	(Bla) <i>ampH</i> is a beta-lactamase found in <i>E. coli</i> .
28	NODE_18	<i>ampH</i>	81.35	AP012030.1:396711-395553	AmpH is a class C <i>ampC</i> -like beta-lactamase and penicillin-binding protein identified in <i>E. coli</i> .
29	NODE_18	<i>acrB</i>	86.41	U00096.3:484403-481253	Protein subunit of AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux complex. AcrB functions as a heterotrimer which forms the inner membrane component and is primarily responsible for substrate recognition and energy transduction by acting as a drug/proton antiporter.
30	NODE_18	<i>acrA</i>	83.33	U00096.3:485619-484425	AcrA is a subunit of the AcrAB-TolC multidrug efflux system that in <i>E. coli</i> .
31	NODE_182	<i>smeR</i>	76.71	AF173226.1:1041-351	SmeR is a component of a two-component signal transduction system that includes <i>smeS</i> and regulates many resistance genes.
32	NODE_19	<i>acrD</i>	81.05	AP009048.1:2586250-2589364	AcrD is an aminoglycoside efflux pump expressed in <i>E. coli</i> . Its expression can be induced by indole and is regulated by <i>baeRS</i> and <i>cpxAR</i> .
33	NODE_20	<i>crp</i>	89.89	AP009048.1:4154296-4153663	Crp is a global regulator that represses <i>mdtEF</i> multidrug efflux pump expression.
34	NODE_2146	<i>mexB</i>	76.94	L11616:1569-4710	MexB is the inner membrane multidrug exporter of the efflux complex MexAB-OprM.

cont. Supplementary table 1. Antibiotic resistance genes identified in virus like particles (VLPs)*

	SEQUENCE	GENE	IDENTITY (%)	ACCESSION	PRODUCT
35	NODE_22	<i>cpxR</i>	78.77	LT673656.1:1885022-1884344	CpxR is directly involved in activation of expression of RND efflux pump MexAB-OprM in <i>P. aeruginosa</i> . CpxR is required to enhance mexAB-oprM expression and drug resistance in the absence of repressor MexR.
36	NODE_23	<i>mdfA</i>	76.66	JQ394987:0-1233	Multidrug efflux pump in <i>E. coli</i> . This multidrug efflux system was originally identified as the Cmr/CmlA chloramphenicol exporter.
37	NODE_24	<i>acrF</i>	77.89	U00096:3415032-3418137	AcrF is a inner membrane transporter similar to AcrB.
38	NODE_24	<i>acrE</i>	76.81	U00096:3413863-3415021	AcrE is a membrane fusion protein similar to AcrA.
39	NODE_260	<i>opmH</i>	78.22	AE004091.2:5584100-5585549	OpmH is an outer membrane efflux protein required for triclosan-specific efflux pump function.
40	NODE_260	<i>emrE</i>	76.13	AE004091.2:5606102-5606435	EmrE is a small multidrug transporter that functions as a homodimer and that couples the efflux of small polyaromatic cations from the cell with the import of protons down an electrochemical gradient. Confers resistance to tetraphenylphosphonium methyl viologen gentamicin kanamycin and neomycin.
41	NODE_27	<i>mexB</i>	78.28	L11616:1569-4710	MexB is the inner membrane multidrug exporter of the efflux complex MexAB-OprM.
42	NODE_2739	<i>lmrB</i>	81.2	JYFL01000006.1:113503-112069	LmrB is a chromosomally-encoded efflux pump that confers resistance to lincosamides in <i>Bacillus subtilis</i> .
43	NODE_28	<i>mexE</i>	79.19	AE004091.2:2808742-2809987	MexE is the membrane fusion protein of the MexEF-OprN multidrug efflux complex.
44	NODE_28	<i>mexF</i>	86.23	AE004091.2:2810008-2813197	MexF is the multidrug inner membrane transporter of the MexEF-OprN complex. mexF corresponds to 2 loci in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and 4 loci in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58.
45	NODE_28	<i>oprN</i>	77.07	AE004091.2:2813193-2814612	OprN is the outer membrane channel component of the MexEF-OprN multidrug efflux complex.
46	NODE_28	<i>muxB</i>	76.3	AE004091.2:2854014-2850882	MuxB is one of the two necessary RND components in the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> efflux pump system MuxABC-OpmB.
47	NODE_2975	<i>rpoB2</i>	76.88	AP006618.1:4835199-4838688	Due to gene duplication the genomes of <i>Nocardia</i> species include both rifampin-sensitive beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB</i>) and rifampin-resistant beta-subunit of RNA polymerase (<i>rpoB2</i>) genes with 88% similarity between the two gene products. Expression of the <i>rpoB2</i> variant results in replacement of rifampin sensitivity with rifampin resistance.
48	NODE_43	<i>kdpE</i>	79.94	U00096.3:721733-721055	KdpE is a transcriptional activator that is part of the two-component system KdpD/KdpE that is studied for its regulatory role in potassium transport and has been identified as an adaptive regulator involved in the virulence and intracellular survival of pathogenic bacteria. KdpE regulates a range of virulence loci through direct promoter binding.
49	NODE_47	<i>msbA</i>	83.13	U00096.3:966620-968369	MsbA is a multidrug resistance transporter homolog from <i>E. coli</i> and belongs to a superfamily of transporters that contain an adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) which is also called a nucleotide-binding domain (NBD). MsbA is a member of the MDR-ABC transporter group by sequence homology. MsbA transports lipid A, a major component of the bacterial outer cell membrane and is the only bacterial ABC transporter that is essential for cell viability.

cont. Supplementary table 1. Antibiotic resistance genes identified in virus like particles (VLPs)*

Gene	Identity (%)	Function
<i>mdtABC</i>	81.4	The MdtABC tripartite complex confers resistance against novobiocin and deoxycholate.
<i>pmrF</i>	79.66	Required for Lipid A modification to resist the antimicrobial activity of antibiotics such as polymyxin
<i>mexK</i>	81.3	MexK system effluxed tetracycline and erythromycin together with outer membrane protein channel OprM.
<i>ampH</i>	81.35	Class D β -lactamases <i>E. coli</i> .
<i>bla</i> _{CMY-104}	85.78	Serine beta-lactamase with a substrate specificity for cephalosporins
<i>bla</i> _{CMY-59}	85.02	AmpC type beta-lactamase
<i>bla</i> _{CMY-157}	86.47	Class C beta-lactamase CMY-157
<i>acrAB</i>	86.41	AcrAB-TolC is Major multidrug efflux pump in <i>E. coli</i> .
<i>acrD</i>	81.05	Aminoglycoside efflux pump component.
<i>mdfA</i>	76.66	MdfA is a multidrug/proton antiporter with a remarkably broad substrate specificity profile
<i>acrEF</i>	77.89	Tripartite efflux system (AcrEF-TolC) involved in the efflux of indole and organic solvents
<i>mexEF- oprN</i>	89.08	MexEF is the multidrug inner membrane transporter of the MexEF-OprN multidrug efflux complex.
<i>msbA</i>	83.13	MsbA is a multidrug resistance transporter that belongs to a superfamily of transporters.
<i>mdtK</i>	78.08	Multidrug efflux pump, that confers resistance to norfloxacin, ciprofloxacin, doxorubicin, trimethoprim, chloramphenicol and fosfomycin.
<i>kpnEF</i>	76.34	Mutation in KpnEF resulted in increased susceptibility to cefepime ceftriaxon colistin erythromycin rifampin tetracycline and streptomycin.
<i>mdtGH</i>	79.16	Multidrug resistance system that confers resistance to norfloxacin and enoxacin.
<i>catB4</i>	100	Chloramphenicol acetyltransferase

* ARGs identification was completed used the most well-known ARGs databases (Papp et al. 2022)

Results and Discussion

A total of 36,071,420 Illumina sequencing reads were generated in paired files with a raw read length of 149 bp and an expected average insert size of 350 bp. Evaluation of DNA contamination by ViromeQC (Zolfo et al. 2019) showed a low abundance of genes encoding prokaryotic or eukaryotic ribosomal RNAs sequences and 27 microbial markers (0.2%, 0.3%, and 0.0001%, respectively). Although contamination with bacterial chromosomal DNA during VLPs purification is relatively frequent and variable, the results suggest minimal contamination. Even the abundance of 16s rRNA sequences could be a consequence of generalized trans-duction events (Tian et al. 2015). A total of 5,783 contiguous sequences (nodes) were assembled. Sequence analysis of nodes showed 59 different ARGs (Table 1 and Supplementary table 1). For many of them, its mobilization by bacteriophages has already been described (Li et al. 2020). Remarkably, the sequence analysis revealed some nodes with several ARGs. For example, in node 142, there were sequences for three β -lactamases: *bla*_{CMY-104}, *bla*_{CMY-59}, and *bla*_{CMY157} (Supplementary table 1). The results showed that

ARGs can be mobilized by phages present in intestinal micro- biota. Also highlight the importance of evaluating the presence of these genetic elements in free-range carni- vores and open the possibility that wildlife animals could participate in its spreading in natural ecosystems. More studies are necessary to describe this phenom- non.

Acknowledgements

This work was supported by Universidad Autónoma Metropolitana and by CONACYT-México. We are grateful with “Fundación para el Manejo y Conservación de la Vida Silvestre A.C”.

References

- Li LG, Huang Q, Yin X, Zhang T (2020) Source tracking of antibiotic resistance genes in the environment – Challenges, progress, and prospects. *Water Res* 185: 116127.
- Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 27: 824-834.

- Papp M, Solymosi N **(2022)** Review and Comparison of Antimicrobial Resistance Gene Databases. *Antibiotics* 11: 339.
- Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J **(2002)** Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* 68: 576-581.
- Subirats J, Sánchez-Melsió A, Borrego CM, Balcázar JL, Simonet P **(2016)** Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents* 48: 163-167.
- Summer EJ **(2009)** Preparation of a phage DNA fragment library for whole genome shotgun sequencing. In: Clokie MRJ, Kropinski AM (eds) *Bacteriophages: methods and protocols*, Volume 2 Molecular and applied aspects. Totowa, NJ: Humana Press, pp 27-46.
- Tian R-M, Cai L, Zhang W-P, Cao H-L, Qian P-Y **(2015)** Rare events of intragenus and intraspecies horizontal transfer of the 16S rRNA gene. *Genome Biol Evol* 7: 2310-2320.
- Zolfo M, Pinto F, Asnicar F, Manghi P, Tett A, Bushman F, Segata N **(2019)** Detecting contamination in viromes using ViromeQC. *Nat Biotechnol* 37: 1408-1412.

Referencias bibliográficas

- Arber W. (2000). Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00529.x>
- Argov, T., Azulay, G., Pasechnek, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Borovok, I., Sigal, N., y Herskovits, A. A. (2017). Temperate bacteriophages as regulators of host behavior. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.002>
- Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004219. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219>
- Borodovich, T., Shkoporov, A. N., Ross, R. P., y Hill, C. (2022). Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. *Gastroenterology Report*, 10. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac012>
- Bowring, J. Z., Su, Y., Alsaadi, A., Svenningsen, S. L., Parkhill, J., & Ingmer, H. (2022). Screening for Highly Transduced Genes in Staphylococcus aureus Revealed Both Lateral and Specialized Transduction. *Microbiology spectrum*, 10(1), e0242321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02423-21>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., y Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 79, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., y Muniesa, M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental Science; Technology*, 48(13), 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calvo-Fernandez, C., y Garcia-Aljaro, C. (2025). Human-wildlife ecological interactions shape *Escherichia coli* population and resistome in two sloth species from Costa Rica. *npj Antimicrobials and Resistance*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00134-y>
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y. N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M. S. J., Fitzgerald, J. R., y Penadés, J. R. (2018). Genome hypermobility by lateral transduction. *Science*, 362(6411), 207–212. <https://doi.org/10.1126/science.aat5867>
- Cross, B. J., Partridge, S. R., y Sheppard, A. E. (2026). Impacts of mobile genetic elements on antimicrobial resistance genes in gram-negative pathogens: Current insights and genomic approaches. *Microbiological research*, 302, 128340. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128340>
- de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., y Dutilh, B. E. (2019). Molecular and evolutionary determinants of bacteriophage host range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>
- Duman, M., Ajmi, N., Tasci, G., y Saticioglu, I. B. (2025). The first isolation and genome characterization of wild-type *Myroides odoratimimus* in ornamental fish. *Academia Molecular Biology and Genomics*, 2(2). <https://doi.org/10.20935/AcadMolBioGen7639>
- Fröhlich, C., Chen, J. Z., Gholipour, S., Erdogan, A. N., y Tokuriki, N. (2021).

Evolution of β -lactamases and enzyme promiscuity. *Protein engineering, design & selection*: PEDS, 34, gzab013. <https://doi.org/10.1093/protein/gzab013>

Haaber, J., Leisner, J. J., Cohn, M. T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J. B., Westh, H., Penadés, J. R., y Ingmer, H. (2016). Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13333>

Hu, J., Chen, J., Nie, Y., Zhou, C., Hou, Q., y Yan, X. (2024). Characterizing the gut phageome and phage-borne antimicrobial resistance genes in pigs. *Microbiome*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01818-9>

Kang, Y., Wang, J., Wang, Y., y Li, Z. (2024). Profiles of phage in global hospital wastewater: Association with microbial hosts, antibiotic resistance genes, metal resistance genes, and mobile genetic elements. *Science of The Total Environment*, 926, 171766. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171766>

Kirsch, J. M., Brzozowski, R. S., Faith, D., Round, J. L., Secor, P. R., & Duerkop, B. A. (2021). Bacteriophage-Bacteria Interactions in the Gut: From Invertebrates to Mammals. *Annual review of virology*, 8(1), 95–113. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-101238>

Ku, H., Kelk, D., Bauer, D. C., y Sidhu, J. P. S. (2025). Phage-plasmid hybrids as vectors for antibiotic resistance in environmental *Escherichia coli*. *The Science of the total environment*, 959, 178157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178157>

Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., y Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature reviews. Microbiology*, 10(7), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>

Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M., y Balcázar, J. L. (2017). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environmental Pollution*, 220, 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>

Li, Y., Han, X., Shi, X., Mao, C., Yu, T., Zhu, Y., Wu, S., Huang, Y., Yu, Y., y Fu, Y. (2025). High transconjugation efficiency of fusion plasmid pNDM_KPC in carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* and its formation driven by IS26-mediated integration. *Microbiology spectrum*, 13(10), e0090525. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00905-25>

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., y Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00424-7)

Lund, D., Parras-Moltó, M., Inda-Díaz, J. S., Ebmeyer, S., Larsson, D. G. J., Johnning, A., y Kristiansson, E. (2025). Genetic compatibility and ecological connectivity drive the dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature communications*, 16(1), 2595. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57825-3>

Mahdavi, S., Sadeghi, M., Shokri, R., y Sadegh, B. (2022). The Role of Bacteriophages as Important Reservoirs of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in Azerbaijan Hospitals. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 28(4), 436–443. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0163>

- McCarthy, A. J., Lindsay, J. A., y Loeffler, A. (2012). Are all meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Veterinary Dermatology*, 23(4), 267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01072.x>
- Michaelis, C., y Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2), 328. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Miltgen, G., Berti, V., Milenkov, M., Schmitt, H., Wagenaar, J. A., y Armand-Lefevre, L. (2026). Circulation of extended-spectrum β -lactamase and plasmid-borne cephalosporinase-producing *Escherichia coli* from a One Health perspective: a narrative review. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 578–590. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.12.003>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., 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., Kashef Hamadani, B. H., 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)
- Napit, R., Gurung, A., Poudel, A., Chaudhary, A., Manandhar, P., Sharma, A. N., Raut, S., Pradhan, S. M., Joshi, J., Poyet, M., Groussin, M., Rajbhandari, R. M., y Karmacharya, D. B. (2025). Metagenomic analysis of human, animal, and environmental samples identifies potential emerging pathogens, profiles antibiotic resistance genes, and reveals horizontal gene transfer dynamics. *Scientific reports*, 15(1), 12156. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90777-8>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., y Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00088-17>
- Stewardson, A. J., Allignol, A., Beyersmann, J., Graves, N., Schumacher, M., Meyer, R., Tacconelli, E., De Angelis, G., Farina, C., Pezzoli, F., Bertrand, X., Gbaguidi-Haore, H., Edgeworth, J., Tosas, O., Martinez, J. A., Ayala-Blanco, M. P., Pan, A., Zoncada, A., Marwick, C. A., Nathwani, D., TIMBER Study Group (2016). The health and economic burden of bloodstream infections caused by antimicrobial-susceptible and non-susceptible Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* in European hospitals, 2010 and 2011: a multicentre retrospective cohort study. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(33), 30319. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.33.30319>
- Vinayamohan, P. G., Pellissery, A. J., y Venkitanarayanan, K. (2022). Role of horizontal gene transfer in the dissemination of antimicrobial resistance in food animal production. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100882. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100882>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M. y Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wen, C., Guan, J., Uea-Anuwong, T., Shang, J., Peng, C., Tang, X., Magouras, I., Sun, Y. y Li, F. (2025). Dissecting the gut microbial communities and resistomes of

wild rats from different ecological areas in Hong Kong. *Environmental research*, 283, 122108. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122108>

Wipf, J. R. K., Schwendener, S., y Perreten, V. (2014). The Novel Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene erm (44) Is Associated with a Prophage in *Staphylococcus xylosus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 6133–6138. <https://doi.org/10.1128/aac.02949-14>

Yu, X., Cheng, L., Yi, X., Li, B., Li, X., Liu, X., Liu, Z., y Kong, X. (2024). Gut phageome: challenges in research and impact on human microbiota. *Frontiers in microbiology*, 15, 1379382. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1379382>

Capítulo dos

Liberación de bacteriófagos en la cepa de *E. coli* PGV 26B-Coy 6 portadora de *stx1* y *stx2* con mitomicina y líquido ruminal.

Introducción

Escherichia coli es uno de los microorganismos en los que su evolución ha sido resultado, en gran medida, de la adquisición de distintos genes (Dobrindt et al., 2010). Algunos de estos genes han sido incorporados desde otros microorganismos mediante la transferencia horizontal de genes (THG) (Frazão et al., 2019), otorgando a *E. coli* la capacidad de sobrevivir y adaptarse a distintas condiciones ambientales, así como permitiendo la emergencia de variantes patógenas (Leimbach et al., 2013).

Las variantes patógenas de *E. coli* corresponden a cepas portadoras de factores de virulencia (FV). Un ejemplo de FV adquiridos mediante THG son las shigatoxinas (Stx) (Li et al., 2025). La presencia de genes que codifican para Stx en el genoma de *E. coli* ha permitido la clasificación de un grupo de cepas conocidas como *E. coli* productoras de shigatoxinas (STEC) (Döpfer et al., 2010). Dentro de este grupo se encuentra el patotipo de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (Etcheverría y Padola, 2013).

Las cepas STEC son de gran importancia en salud pública debido a la elevada morbilidad y mortalidad que ocasionan anualmente (Liu et al., 2022). Las infecciones por STEC pueden provocar diarrea hemorrágica severa, deshidratación y, en los pacientes que sobreviven, el desarrollo del síndrome urémico hemolítico. Esta afección puede causar insuficiencia renal aguda y, en algunos casos, sintomatología neurológica asociada (Khalid et al., 2023; Vanesse et al., 2023).

Algunas de las cepas STEC de relevancia en salud pública han sido aisladas de rumiantes domésticos, silvestres y otros animales de fauna silvestre (Chui et al., 2015). Entre las más importantes se encuentra *E. coli* O157:H7, que es una de las principales causantes de brotes de enfermedades entéricas en humanos (Ray y Singh, 2022). Esta enfermedad es considerada una zoonosis y un agente contaminante de alimentos, además de clasificarse como una enfermedad emergente y reemergente (Dallman et al., 2022; Kolodziejek et al., 2022).

Estudios en bisontes (*Bison bison*) revelan que esta especie puede actuar como un reservorio de *E. coli* O157:H7 portadora de shigatoxinas, con una prevalencia fecal promedio del 42.1% y una prevalencia en la mucosa rectoanal del 19.9%. Estos aislados de bisonte poseían los genes de virulencia *stx2*, *eae*, *hlyA* y *fliC*, lo que indica su potencial patógeno para humanos (Reinstein et al., 2007). Investigaciones más recientes en bisontes de vida libre en México identificaron cepas de *E. coli* con perfiles de virulencia atípicos, incluyendo combinaciones inusuales de genes como *stx2*, *eae* e *ial*, y una notable resistencia a múltiples antimicrobianos, incluyendo betalactámicos, cloranfenicol y aminoglucósidos (López-Islas et al., 2024).

Ray y Singh (2022) afirman que el ganado vacuno es el principal reservorio de *E. coli* productora de shigatoxinas (STEC), destacando que la colonización asintomática y la eliminación fecal masiva constituyen factores clave en la contaminación de alimentos y del medio ambiente. De igual forma, carnívoros silvestres como los coyotes (*Canis latrans*) y rumiantes silvestres como bisontes y ciervos también presentan con frecuencia la presencia de genes *stx*, particularmente el subtipo *stx2*, que se asocia con las formas más graves de enfermedad en humanos, como el síndrome urémico hemolítico (Ray y Singh, 2022).

En un estudio realizado por López-Islas y colaboradores (2022), se reportó una prevalencia de *E. coli* portadoras de genes de virulencia del 75.4% en carnívoros silvestres del norte de México, incluyendo coyotes (*Canis latrans*), zorras del desierto (*Vulpes macrotis*) y zorrillos (*Mephitis macroura*). Entre los genes identificados se encontraron *stx1*, *stx2*, *escV* y *eae*, en diversas combinaciones, asimismo, se documentó la presencia de múltiples serotipos, entre ellos O153, O175, O139, O75, O21, O17, O110, O63, O93 y O96.

Por otra parte, la emergencia de nuevos serotipos de STEC (como O113, O91 y O22), así como de cepas híbridas que combinan factores de virulencia de distintos patotipos, junto con el incremento en la resistencia a antimicrobianos —incluyendo colistina y cefalosporinas de espectro extendido—, ha sido documentada tanto en ganado como en fauna silvestre (Ray y Singh, 2022).

Un ejemplo de un brote emergente de *E. coli* más relevantes de los últimos años fue el ocurrido en Alemania en 2011, causado por una cepa híbrida EAEC/STEC O104:H4 portadora de los genes *stx2* y *agg*. Dicha variante fue responsable de aproximadamente 4,000 casos de enteritis hemorrágica aguda y un total de 50 muertes (Jandhyala et al., 2013). El análisis genético de la cepa involucrada reveló la presencia de un conjunto de genes característicos de diversos patotipos de *E. coli*, los cuales fueron adquiridos mediante THG (Zhou et al., 2015). En particular, el gen *stx2* fue incorporado a través de la transducción mediada por un bacteriófago portador de dicho gen (Beutin et al., 2013).

Las shigatoxinas presentes en las cepas STEC se clasifican en dos grandes grupos: *stx1*, con tres subtipos (*stx1a*, *stx1b* y *stx1c*), y *stx2*, con siete subtipos (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*) (Baranzoni et al., 2016; Krüger et al., 2018). Las Stx están codificadas en el genoma de bacteriófagos del género *Lambdavirus*; en algunos casos, estos bacteriófagos pueden encontrarse integrados de manera críptica en el genoma bacteriano, perdiendo la capacidad de liberarse de su hospedero (Fang et al., 2022). Sin embargo, los bacteriófagos del género *Lambdavirus* podrían participar en la THG cuando son inducidos y se liberan del genoma bacteriano (Meyer et al., 2012).

Los bacteriófagos que son inducidos desde el genoma de una bacteria pueden generar tres diferentes tipos de ciclos virales en una bacteria hospedera, conocidos como ciclo lisogénico, ciclo pseudolisogénico y ciclo lítico (Li et al., 2024; Gandon, 2016).

En el ciclo lisogénico, un bacteriófago que proviene de una infección previa infecta a una bacteria susceptible. Durante una infección exitosa, el bacteriófago introduce su material genético (MG) en la célula bacteriana y, mediante enzimas como las integrasas, dicho material genético se integra en el genoma bacteriano, formando un profago (Kasman y Porter, 2022). Este nuevo material genético puede recombinarse a través del sistema de recombinación RecA con el genoma de la bacteria hospedera, dando lugar a cepas con variantes genéticas. Este proceso es conocido como transducción mediada por bacteriófagos. Este mecanismo contribuye a la aparición de nuevas variantes genéticas, incluyendo la emergencia de nuevas cepas patógenas de *E. coli* (Fillol-Salom et al., 2019).

En el ciclo pseudolisogénico, un bacteriófago infecta exitosamente a una bacteria e introduce su material genético (MG), sin embargo, este material permanece en estado quiescente en el citoplasma bacteriano sin integrarse al genoma (Łoś y Węgrzyn, 2012). Posteriormente, dependiendo de las condiciones internas y externas de la bacteria hospedera, el bacteriófago puede entrar en un ciclo lítico o establecer un ciclo lisogénico (Łoś y Węgrzyn, 2012).

En el ciclo lítico, el MG del bacteriófago se replica utilizando la maquinaria genética de la bacteria con el objetivo de producir nuevos viriones. De manera paralela, se sintetizan

enzimas líticas que permiten la liberación de los viriones mediante la lisis de la célula bacteriana, lo que inicia nuevos ciclos infecciosos (Hobbs y Abedon, 2016).

Estos tres ciclos se encuentran relacionados, ya que, tras un ciclo lítico, las nuevas partículas virales pueden infectar un hospedador y se puede establecer un estado pseudolisogénico o iniciarse un ciclo lisogénico (Łoś y Węgrzyn, 2012). Esta interconexión favorece eventos de evolución bacteriana mediada por la transferencia horizontal de genes y contribuye a la aparición de nuevas variantes de cepas patógenas (Zhang et al., 2022).

El ciclo lítico y el ciclo lisogénico han contribuido a la evolución de cepas de *E. coli* hacia el patotipo STEC, particularmente en el caso de los bacteriófagos lambdoides (Salmond y Fineran, 2015; Carter et al., 2021). A pesar de que algunos bacteriófagos del género Lambda pueden volverse crípticos, una fracción de los bacteriófagos lambdoides mantiene su capacidad de excindirse, lo que permite que, bajo ciertas condiciones, se inicie un nuevo proceso lítico (Gandon, 2016).

En los bacteriófagos del género Lambda, la regulación entre los ciclos lítico y lisogénico ha sido ampliamente estudiada (Koudelka et al., 2004; Shao et al., 2019). Para dar inicio al proceso de inducción de la lisis bacteriana y la liberación de nuevos viriones, se requiere una respuesta finamente regulada por un conjunto de proteínas (Lee et al., 2015). Entre las proteínas clave involucradas en la inducción del ciclo lítico se encuentra la proteína CI, codificada por el gen *ci*, presente en el genoma de los bacteriófagos del género Lambda (Serra-Moreno et al., 2008).

La proteína CI actúa como un represor transcripcional al bloquear la expresión de los genes asociados al proceso de lisis bacteriana (Serra-Moreno et al., 2008). Para ello, CI forma estructuras oligoméricas que se unen a los sitios operadores OR (operador derecho) y OL (operador izquierdo), fenómeno asociado a su función de autorregulación (Tyler et al., 2004). Esta oligomerización impide la unión de la ARN polimerasa a los promotores correspondientes, inhibiendo la transcripción de las regiones OR y OL y, en consecuencia, el inicio del ciclo lítico (Shi y Friedman, 2001).

Esto se debe a que las regiones OR y OL regulan la transcripción de los genes asociados a la lisis bacteriana, y se encuentran separadas por aproximadamente 2.4 kilobases (Hochschild y Lewis, 2009). El operador OR está compuesto por tres sitios (OR1, OR2 y OR3) y se localiza entre dos promotores: PR (promotor derecho) y PRM (promotor de mantenimiento del represor del fago lambda). Por su parte, el operador OL está conformado por tres sitios (OL1, OL2 y OL3) y un único promotor, PL (promotor izquierdo) (Hochschild y Lewis, 2009).

No obstante, la proteína CI también puede actuar como un activador transcripcional del gen *ci*, regulando positivamente su propia expresión y manteniendo el estado lisogénico (Koudelka et al., 2004; Hochschild y Lewis, 2009).

Para que se inicie el ciclo lítico es necesario el corte proteolítico de los oligómeros de la proteína CI (Hochschild y Lewis, 2009). Este proceso ocurre mediante una reacción autocatalítica inducida por la interacción de la proteína RecA con CI. El sitio consenso para que se lleve a cabo el corte autocatalítico es una región dipeptídica que, según se ha reportado, puede ser alanina-glicina, cisteína-glicina y leucina-glicina (Koudelka, 2004). La degradación de CI libera los operadores OR y OL, permitiendo la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción de los genes asociados a la lisis (Shi y Friedman, 2001; Hochschild y Lewis, 2009).

El corte proteolítico de la proteína CI mediado por RecA depende de la activación del sistema SOS de respuesta al daño y reparación del ADN (Galkin et al., 2009). En condiciones normales, los genes SOS permanecen reprimidos por la proteína LexA. Sin

embargo, tras el daño al ADN, LexA sufre un corte autolítico mediado por filamentos activados de RecA, lo que permite la eliminación del represor de la transcripción de los genes SOS y, a su vez, la transcripción por la ARN polimerasa (Adikesavan et al., 2011). De este modo, la proteína RecA desempeña un papel central en la regulación de la decisión lisis–lisogenia, ya que su concentración y estado de activación determinan la inducción del ciclo lítico y la expresión de genes del bacteriófago (Mo et al., 2017). En este contexto, la formación del complejo funcional RecA–LexA actúa como un regulador clave de la respuesta SOS requerida para la lisis bacteriana mediada por bacteriófagos (Mo et al., 2017; Imamovic y Muniesa, 2018).

Los genes de la respuesta SOS pueden activarse por diversos estímulos, entre ellos la exposición a luz ultravioleta (UV), la presencia de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno, sustancias bactericidas como algunos péptidos antimicrobianos, mecanismos inmunitarios bacterianos (por ejemplo, los sistemas toxina–antitoxina) y antibióticos como la mitomicina C, la ciprofloxacina y la ampicilina (Erill et al., 2007; Keller et al., 2001). Una vez activados, los genes de la respuesta SOS pueden estimular los mecanismos de inducción de bacteriófagos y promover la lisis bacteriana (Erill et al., 2007).

Un ejemplo clásico de este fenómeno es el uso de mitomicina C para la inducción experimental de bacteriófagos (Berger et al., 2019; Serment-Guerrero et al., 2020). La mitomicina C induce la formación de enlaces cruzados intercalados en el ADN (Shanmughapriya et al., 2017); la presencia de estas lesiones es detectada como daño en el material genético, lo que activa la respuesta SOS mediante el complejo RecA–LexA y desencadena el inicio del ciclo lítico de bacteriófagos presentes en el genoma bacteriano (Gao et al., 2023; VanLoock et al., 2003).

Posterior al ciclo lítico, los bacteriófagos son liberados; sin embargo, este proceso requiere la acción de la holina, codificada por el gen *holin*. Esta proteína forma poros en la membrana citoplasmática en un momento específico del ciclo infeccioso, permitiendo que la endolisina acceda al peptidoglicano y degrade la pared bacteriana (Young, 2014; Cahill y Young, 2019). En muchos bacteriófagos de bacterias gramnegativas, este proceso se complementa con las proteínas de expansión (*spanin*) (codificadas por los genes *Rz* y *Rz1*), las cuales desestabilizan la membrana externa, completando así la lisis celular (Young, 2014).

Para la formación de nuevos viriones, es necesario el ensamblaje de proteínas estructurales que dan lugar a una arquitectura compleja, caracterizada por una cápside icosaédrica que alberga el genoma viral y una cola especializada en el reconocimiento e inyección del ADN en la célula bacteriana (Dion et al., 2020). La morfogénesis de estas partículas está estrictamente regulada por módulos genéticos conservados, cuyo estudio ha permitido dilucidar los mecanismos fundamentales del ensamblaje viral (Casjens y Hendrix, 2015).

En bacteriófagos como P2 y otros bacteriófagos relacionados de la familia Peduoviridae, el empaquetamiento del ADN requiere la acción de la terminasa, un complejo enzimático codificado por los genes *terS* y *terL* (Casjens y Hendrix, 2015). Este complejo reconoce secuencias específicas (*pac*) y escinde el ADN concatemerizado para posteriormente translocar al interior de la procápside mediante la hidrólisis de ATP (Feiss y Rao, 2012).

La estructura de la cola, esencial para la fijación al huésped y la transferencia del ADN, involucra múltiples componentes codificados en operones específicos (Dams y Lavigne, 2022). Los genes estructurales incluyen proteínas de la cola (*tail proteins*) y de la vaina (*tail sheath proteins*), que conforman la estructura contráctil, así como proteínas de las fibras caudales (*tail fiber proteins*) y de la placa basal (*baseplate proteins*), las cuales determinan el tropismo mediante el reconocimiento de receptores en la superficie de las bacterias (Casjens y Hendrix, 2015).

La proteína de medición de la cola (*tape measure protein*) regula la longitud de la cola, mientras que la proteína adaptadora cabeza-cola (*head–tail adaptor protein*) asegura la correcta unión entre la cápside y la cola (Cumby et al., 2015; Davidson et al., 2012). Estos genes se han reportado como genes estructurales asociados a bacteriófagos (Penadés et al., 2019; Rodríguez-Rubio et al., 2021; Bhattacharjee et al., 2022).

Este repertorio genético permite a los bacteriófagos ensamblar partículas infecciosas funcionales y adaptarse evolutivamente a distintos huéspedes bacterianos mediante variaciones en las proteínas de adhesión (Dion et al., 2020; Davidson et al., 2012).

Los bacteriófagos capaces de ser inducidos desde el genoma bacteriano por distintos estímulos dentro de un microambiente, como el tracto gastrointestinal, pueden generar un impacto significativo sobre las poblaciones bacterianas (Mirzaei y Maurice, 2017). Esto se debe a que la inducción de bacteriófagos desencadena procesos de lisis en distintas bacterias, ya sea para iniciar nuevos ciclos líticos o para establecer procesos de lisogenia (Mirzaei y Maurice, 2017).

Estos mecanismos son relevantes en la ecología bacteriana por dos razones principales. En primer lugar, los eventos de depredación bacteriana mediada por bacteriófagos pueden provocar cambios en la abundancia y frecuencia de las poblaciones bacterianas, generando, en algunos casos, recambios de especies (Shkoporov et al., 2022). Durante este proceso, las interacciones bacterias–hospederos pueden verse alteradas, dando lugar a un fenómeno conocido como disbiosis (Mirzaei y Maurice, 2017). En condiciones de disbiosis, la abundancia de bacterias patógenas puede incrementarse, impactando negativamente en la salud del hospedero (Mirzaei y Maurice, 2017). La segunda razón, la transferencia horizontal de genes (THG) mediada por bacteriófagos, puede originar cambios genéticos en las poblaciones bacterianas, modificando las características genéticas de algunas poblaciones bacterianas (Shuwen y Kefeng, 2022; Howard et al., 2024).

Se ha observado que la composición de las poblaciones bacterianas y de bacteriófagos puede modificarse en respuesta a diversos componentes ambientales asociados a la dieta. Entre estos factores se incluyen ciertos carbohidratos, el aumento en el consumo de fibra, la presencia de ácidos grasos de cadena corta, metabolitos secundarios derivados tanto del hospedador como del metabolismo bacteriano, así como compuestos presentes en alimentos como uvas, semillas de uva y canela. En algunos casos, estos cambios se han asociado con un incremento en la abundancia de partículas de bacteriófagos, lo que podría estar relacionado con procesos de inducción y liberación de estos (Henrot y Petit, 2022; Howard et al., 2024; Marongiu et al., 2021; Oh et al., 2019).

Muchos de estos componentes forman parte habitual de la dieta de diversos animales, incluidos los rumiantes. En este contexto, la dinámica poblacional de la microbiota ruminal podría estar determinada, en gran medida, por la presencia de bacteriófagos y un aumento en su producción, lo cual podría asociarse a procesos de lisis–lisogenia mediada por la presencia de bacteriófagos y favorecida por inductores presentes en la dieta (Oh et al., 2019; Sausset et al., 2020; Chevallereau et al., 2021).

Los mecanismos de lisis–lisogenia inducidos por componentes presentes en el rumen, derivados de la dieta o del metabolismo celular bacteriano y del hospedero, podrían favorecer el incremento en la adquisición de genes de virulencia, como los genes *stx*, generando las distintas variantes de STEC reportadas en rumiantes y contribuyendo a la aparición de brotes emergentes de enfermedades en humanos (Elder y Nightingale, 2013). Por lo tanto, los rumiantes desempeñan un papel clave en la generación y mantenimiento de enterobacterias patógenas.

Con base en lo anterior, la hipótesis de este trabajo es que algunos componentes en el líquido ruminal pueden inducir la liberación de bacteriófagos en cepas portadoras de factores de virulencia, como las shigatoxinas. Este fenómeno podría ocurrir incluso en cepas que no han sido aisladas de rumiantes, lo que indicaría que el líquido ruminal contiene componentes capaces de favorecer la propagación natural de factores de virulencia entre distintas cepas de *E. coli*, dando lugar a nuevas variantes patógenas.

En este estudio se evaluó la inducción con líquido ruminal de bacteriófagos en cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV), previamente recuperadas de fauna silvestre. Específicamente, las cepas analizadas provienen de: 1) carnívoros, entre los que se incluyen coyotes (*Canis latrans*), zorras del desierto (*Vulpes macrotis*) y zorrillos listados (*Mephitis macroura*); y 2) rumiantes, en este caso bisontes (*Bison bison*).

Materiales y métodos

Selección de cepas de *E. coli* PGV. Se utilizó un banco de 136 cepas de *Escherichia coli* PGV de origen silvestre resguardadas en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Las cepas fueron previamente aisladas de coyotes (*Canis latrans*), zorras grises (*Urocyon cinereoargenteus*), zorras del desierto (*Vulpes macrotis*), lince (*Lynx rufus*), mapaches (*Procyon lotor*), tejones (*Taxidea taxus*), zorrillos listados (*Mephitis macroura*), zorrillos con capucha (*Mephitis mephitis*) y bisontes (*Bison bison*).

Los individuos muestreados fueron recolectados en la Reserva de la Biósfera de Janos, Chihuahua, donde estas especies cohabitan. Las cepas fueron previamente genotipificadas mediante PCR en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, y serotipificadas mediante aglutinación en placa en el Hospital Infantil Federico Gómez, bajo la supervisión del Dr. Carlos Eslava Campos. Asimismo, las cepas fueron nuevamente genotipificadas por PCR en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM Xochimilco, bajo la dirección del Dr. Daniel Martínez Gómez (Cuadro 1) (López-Islas et al., 2022; López-Islas et al., 2024).

Para el presente estudio se seleccionaron nueve cepas (Cuadro 1). Las cepas elegidas presentan en su genoma los genes *stx1* y *stx2*, los cuales se ha reportado que tienen la capacidad de ser transferidos mediante bacteriófagos (Dobrindt, 2005). Asimismo, se seleccionaron cepas que contienen los genes *escV* y *eae*, ya que se ha descrito que estas secuencias pueden encontrarse flanqueadas por regiones asociadas con profagos (Chandry et al., 2012).

Por otro lado, se incluyeron cepas que presentan en su genoma el gen *ial*, el cual no ha sido reportado como movilizable mediante bacteriófagos (Kampmeier et al., 2018). Otro criterio de selección fue que las nueve cepas fueran diferentes entre sí, ya fuera a nivel genético, presentando variaciones en los factores de virulencia, o a nivel fenotípico, considerando diferencias en el serogrupo o, al menos, en el serotipo.

Asimismo, se procuró que las cepas hubieran sido aisladas de diferentes hospederos, incluyendo rumiantes y carnívoros, debido a que estas especies coexisten en el mismo entorno y área geográfica.

Cuadro 1. Cepas de *E. coli* PGV previamente aisladas, genotipificadas y serotipificadas.

Cepa	Patotipo asociado	Factores de virulencia	Orden	Especie	Serogrupo	Serotipo
26-B Coy 6	EHEC	<i>stx1</i> , <i>stx2</i>	Carnívoro	Coyote	O17	O17:H18

Coy 3-19	EHEC	<i>stx1, stx2</i>	Carnívoro	Coyote	O153	O153:H28
Meph 15-8	aEPEC	<i>escV, eae</i>	Carnívoro	Zorrillo	O139	O139:H6
B16(1)32	EHEC, EPEC, EIEC	<i>stx2, eae, ial</i>	Rumiante	Bisonte	O22	O22:H8
B26(2)3	aEPEC, EIEC	<i>escv, eae, ial</i>	Rumiante	Bisonte	O26	O26:H11
B26(6)6	EPEC, EIEC	<i>escv, eae, bfpB, ial</i>	Rumiante	Bisonte	O26	O26:H*
B26(6)31	EPEC, EIEC	<i>eae, ial</i>	Rumiante	Bisonte	O26	O26:H11
B2-31(2)33	EHEC	<i>stx1, stx2</i>	Rumiante	Bisonte	112ab	112ab:H2
B2-31(2)36	EHEC	<i>stx1, eae</i>	Rumiante	Bisonte	O8	O8:H14

* antígeno flagelar no reconocido.

Curvas de crecimiento en caldo Luria–Bertani. Las nueve cepas de *E. coli* PGV se inocularon en tubos de vidrio de 10 mL que contenían caldo Luria–Bertani (LB) (10 g de NaCl, 5g de levadura y 10 g de triptona, por un litro de agua bidestilada) y se incubaron en agitación a 37°C durante una noche. Posteriormente, a cada cepa se le determinó la densidad bacteriana mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀) (Espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730 UV/VIS), con el fin de estimar la concentración de bacterias por mL. Los nueve ensayos se realizaron por triplicado.

Una vez realizada la cuantificación por absorbancia, los crecimientos bacterianos de *E. coli* PGV se ajustaron a una densidad celular uniforme mediante diluciones seriadas, hasta alcanzar una concentración equivalente a 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a 0.5 en la escala de McFarland. Posteriormente, se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en matraces Erlenmeyer de 50 mL que contenían 49 mL de caldo LB, los cuales se incubaron en agitación a 37 °C durante 12 horas, cada experimento se realizó por triplicado (n=3).

Durante la cinética de crecimiento, se cuantificó la absorbancia a OD₆₀₀ (Espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730 UV/VIS) cada 2 horas posteriores a la inoculación. Este procedimiento se realizó con la finalidad de establecer el patrón de crecimiento normal de las cepas de *E. coli* PGV en condiciones estándar.

Preparación del líquido ruminal. El líquido ruminal se obtuvo de tres vacas (*Bos taurus*) de la raza Holstein, de 4 años de edad, en estabulación, bajo condiciones de clima templado y destinadas a la producción de leche. Su dieta consistía principalmente en ensilado de maíz y concentrado de sorgo y maíz. La toma de muestra se realizó bajo sujeción y en manga de manejo con el fin de evitar el mayor estrés posible según indica la NOM-051-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999.

De cada animal se obtuvieron aproximadamente 500 mL de líquido ruminal mediante el uso de una sonda gástrica y fueron depositados en frascos de vidrio estériles de 500 mL. Las muestras se mantuvieron en refrigeración durante tres horas hasta su procesamiento en el laboratorio. Posteriormente, los líquidos ruminales se mezclaron para homogeneizar el contenido.

Con la finalidad de eliminar componentes insolubles, materia orgánica y bacterias presentes en el líquido ruminal, las muestras fueron procesadas mediante centrifugación y filtración de la siguiente manera:

En el laboratorio, el líquido ruminal se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó en una centrífuga (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8) a $3,260 \times g$ durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recuperó únicamente la fase acuosa (sobrenadante) mediante decantación.

El sobrenadante se filtró secuencialmente a través de membranas de nitrocelulosa (EMD Millipore MF-Millipore) con diámetros de poro de 1.1 μm , 0.8 μm , 0.45 μm y 0.22 μm . Una vez filtrado, el líquido ruminal se colocó nuevamente en tubos cónicos de 50 mL y se sometió a una prueba de esterilidad mediante la siembra de una alícuota de 50 μL en agar nutritivo (BD Agar Nutritivo Difco™), incubándose a 37 °C durante una noche.

Tras confirmar la ausencia de crecimiento bacteriano, las muestras se conservaron en refrigeración hasta su uso.

Del líquido ruminal previamente filtrado se generaron dos soluciones base (stocks), las cuales se utilizaron como medios de crecimiento e inducción bacteriana. Las características de estos stocks fueron las siguientes: 1) Líquido ruminal (LR) sin modificación adicional y 2) Líquido ruminal nutritivo, suplementado con 10 g de NaCl/L, 5 g de extracto de levadura/L y 10 g de peptona/L (LRN). Tanto el LR como el LRN se ajustaron a un pH de 7.02 mediante la adición de NaOH. Posteriormente, estos stocks se combinaron con distintas proporciones de caldo LB para obtener diferentes medios experimentales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición de Medios Experimentales

Medio Experimental	Composición de la Base (Stock)	Proporción de Líquido Ruminal	Nutrientes de Caldo LB
LR100%	Líquido ruminal (sin modificar)	100%	No contiene
LRN100%	Líquido ruminal suplementado*	100%	Contiene 10 g de NaCl/L, 5 g de extracto de levadura/L y 10 g de peptona/L
LRN75%	Líquido ruminal suplementado*	75%	Contiene 10 g de NaCl/L, 5 g de extracto de levadura/L y 10 g de peptona/L

LRN50%	Líquido ruminal suplementado*	50%	Contiene 10 g de NaCl/L, 5 g de extracto de levadura/L y 10 g de peptona/L
LRN25%	Líquido ruminal suplementado*	25%	Contiene 10 g de NaCl/L, 5 g de extracto de levadura/L y 10 g de peptona/L

* **pH:** Todos los medios fueron ajustados a un pH de 7.02 mediante la adición de NaOH.

Inducción de bacteriófagos en cepas de *E. coli* PGV con mitomicina C. Las nueve cepas seleccionadas de *E. coli* PGV se inocularon por triplicado, en tubos de vidrio de 10 mL que contenían caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron en agitación a 37°C durante una noche completa. Posteriormente, se realizó la cuantificación bacteriana mediante el método previamente descrito y las cepas se estandarizaron a una concentración equivalente a 0.5 de McFarland 1×10^8 UFC/mL.

A partir de las suspensiones estandarizadas, se tomó 1 mL de cada cepa cultivada en caldo LB y se inoculó en tubos de vidrio que contenían 8.9 mL de caldo LB fresco, los cuales se incubaron a 37°C. Tras 2 horas de crecimiento bacteriano, se añadieron 100 µL de mitomicina C (Fisher BioReagents™) a una concentración de 50 µg/mL (diluida en agua estéril), con el objetivo de obtener una concentración final de 0.5 µg/mL. Posteriormente, se monitorea el crecimiento bacteriano mediante la medición de la absorbancia a 600 nm (OD₆₀₀) (Espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730 UV/VIS) cada 2 horas durante un periodo total de 12 horas (Otsuji et al., 1959; Little, 2014; Imamovic y Muniesa, 2018).

Concentración de bacteriófagos. Las cepas que mostraron un declive significativo en el crecimiento bacteriano tras la inducción con mitomicina C (Fisher BioReagents™) fueron seleccionadas para el enriquecimiento de bacteriófagos. Dichas cepas se inocularon en tubos de vidrio con 10 mL de caldo LB y se incubaron a 37°C durante una noche completa.

Posteriormente, se cuantificó la densidad bacteriana mediante absorbancia a OD₆₀₀ y las suspensiones se estandarizaron nuevamente a una concentración equivalente a 0.5 de McFarland 1×10^8 UFC/mL. A partir de estas suspensiones, se tomaron 5 mL de cada cepa y se inocularon en matraces que contenían 50 mL de caldo LB y se incubaron a 37°C en agitación.

Tras 2 horas de crecimiento bacteriano, en la fase de crecimiento exponencial, se adicionaron 0.5 mL de mitomicina C a una concentración de 50 µg/mL a cada cultivo. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 37°C en agitación y se realizó el seguimiento del crecimiento bacteriano mediante mediciones de absorbancia a OD₆₀₀ cada 2 horas durante 6 horas, así como una medición adicional a las 24 horas.

Finalmente, los cultivos fueron centrifugados a 3,260 x g, durante 15 minutos y el sobrenadante se recuperó en tubos cónicos de 50 mL para la posterior purificación de bacteriófagos.

Purificación de bacteriófagos crecidos en LB, LB+mitomicina C y líquido ruminal. Los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de inducción con mitomicina C y de las distintas condiciones de líquido ruminal se colocaron en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 3,260 x g, durante 20 minutos a 4°C (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8). Posteriormente, se recuperaron tanto el sobrenadante como el pellet bacteriano; este último se refrigeró a 4°C para su posterior procesamiento. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El sobrenadante se filtró de manera secuencial a través de membranas con tamaños de poro de 0.8 µm, 0.45 µm y 0.22 µm (Luong et al., 2020). A los filtrados se les realizó una prueba de esterilidad, sembrando 500 µL en cajas Petri con agar nutritivo e incubando a 37°C durante 24 horas.

Los sobrenadantes filtrados se colocaron en membranas tubulares de diálisis de celulosa (25 mm de diámetro, Sigma-Aldrich®, D9777), con un punto de corte de 12 kDa, previamente lavadas con agua corriente durante 3 horas. Las membranas con los sobrenadantes se introdujeron en soluciones saturadas de dextrosa al 70%, en condiciones estáticas y a temperatura ambiente, con el fin de favorecer la salida de líquido y concentrar los bacteriófagos presentes en los distintos medios de inducción.

Posteriormente, se recuperaron 4 mL del contenido de las membranas, los cuales se filtraron nuevamente a través de membranas de 0.22 µm. Las muestras concentradas se colocaron en una ultracentrífuga Beckman (L-80 ultracentrifuge, rotor Beckman 50.3 Ti) a 200,700 x g durante 2 horas a 4 °C. Posterior a la centrifugación, se recuperó el pellet viral, al cual se le añadieron 1 µL de DNasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich®) y 1 µL de RNasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich®), incubándose a 37°C durante 30 minutos, con el objetivo de eliminar material genético libre no protegido por la cápside viral. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior extracción de material genético.

Extracción de material genético de bacteriófagos y *E. coli* PGV. Los pellets de bacteriófagos obtenidos a partir de los distintos tratamientos de inducción, así como las cepas de *E. coli* PGV en las que se logró la inducción, se colocaron en crioviales de 1.5 mL. A cada muestra se le adicionaron 500 µL de solución de lisis total (isotiocianato de guanidina 5 M, Tris-HCl 100 mM pH 6.4, EDTA 50 mM pH 8 y Triton X-100 al 2.5 %) y se homogeneizaron durante 10 minutos, por agitación suave en un orbitador (Orbitron Rotator II).

Posteriormente, se añadieron 50 µL de sílica (Sigma-Aldrich®), previamente preparada (6 g sílice en 5 ml de agua desionizada y acidificada con 66 µL de HCl 36-38%, J.T. Baker®), y se homogeneizó nuevamente durante 10 minutos, por agitación suave. Las muestras se centrifugaron a 12,353 x g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Al pellet de sílica obtenido se le agregaron 500 µL de etanol al 70% y se homogeneizó para realizar una etapa de limpieza. Las muestras se centrifugaron a 12,353 x g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue decantado cuidadosamente.

A continuación, se añadieron 500 µL de acetona fría y las muestras se incubaron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron (Microcentrífuga Fresco™ 21, Thermo Scientific™) a 12,353 x g durante 20 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, la acetona fue decantada y el pellet de sílica se dejó secar a 37°C durante 10 minutos. El ADN se recuperó agregando buffer TE (Tris-HCl 100 mM pH 6.4 y EDTA 50 mM pH 8) al pellet de sílica y se incubó a 56°C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 16,060 x g durante 5 minutos y se recuperó el ADN de la fase acuosa (método modificado de Batalini et al., 2020).

La concentración del ADN extraído se determinó mediante espectrofotometría UV a 260 nm, y posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración final de 10 µg/mL de ADN.

Amplificación por PCR de genes bacterianos y de bacteriófagos. Se realizó la amplificación del gen *stx2* con la finalidad de determinar la presencia del gen de la shigatoxina en el ADN bacteriano y viral. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *stx2* fueron: F 5'-CGT TTT GAC CAT CTT CGT CTG-3' y R 5'-AGC GTA AGG CTT CTG CTG TG-3' (López-Islas et al., 2024), generando un amplicón de 325 pb (Cuadro 2).

Para la detección de genes asociados a bacteriófagos, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el programa DNAMAN v5.2.2 (Lynnon Biosoft, Canada). Los genes evaluados fueron *tail*, *holin* y *terminase* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para evaluación por PCR punto final en este estudio.

Gen evaluado	Oligonucleótidos	Amplicon	Referencia
<i>stx2</i>	F 5'-CGT TTT GAC CAT CTT CGT CTG-3' R 5'-AGC GTA AGG CTT CTG CTG TG-3'	325 pb	López-Islas et al., 2024
<i>stx1</i>	F 5'-GGC CTT ATG TAA TGA CTG C-3' R 5'-ATC CCA CGG ACT CTT CCA TC-3'	210 pb	López-Islas et al., 2024
<i>tail</i>	F 5'-GTA AGT ATG CCC GCC TGT TC-3' R 5'-ATG GCA CCG ATA TAA TCC ACT G-3'	189 pb	Este estudio
<i>capsid</i>	F 5'- TCC TGC CAT TCT TCA TCT TC-3' R 5'- GAT GAA ACT GAA GAA GAT GCA	300 pb	Este estudio
<i>holin</i>	F 5'-CGT CAT ACA TCC AGT TAT TGC GG-3' R 5'-TTC TCT TCT GGC CCG AAT GG-3'	178 pb	Este estudio
<i>terminase</i>	F 5'-GGA TGT GAA GGA TGT GAA ATG G-3' R 5'-CAC CAT AAC GAC TAC CAT CCG-3'	344 pb	Este estudio

Para el ensayo de PCR punto final, se utilizó un kit comercial (PCR Master Mix de Thermo Fisher®), siguiendo el protocolo del fabricante. Para la amplificación de los productos de PCR se usó un termociclador (Techne® TC-512 Thermal Cycler). Las condiciones de

amplificación por PCR fueron las mismas para los cinco pares de oligonucleótidos utilizados: desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto, alineamiento a 57°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto, durante 30 ciclos.

Para visualizar el tamaño del amplicón, se realizó una electroforesis utilizando una fuente de poder (PowerPac™ HC Bio-Rad) y una cámara de electroforesis horizontal (W Sub-Cell GT Mini Bio-Rad). Las condiciones de corrida fueron 60 V y 250 mA durante 50 minutos.

La visualización de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 2% (Thermo Scientific™ Agarose TopVision) mediante un fotodocumentador de geles (Gel Doc XR+ Gel Documentation System Bio-Rad).

Cuantificación de genes por PCR en tiempo real (qPCR). La cuantificación de los genes *stx1* y *tail* se realizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) en muestras de ADN viral y bacteriano. Como control endógeno se utilizó el gen *dxs* (1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa) presente en *E. coli*, considerado un gen de copia única (Plotka et al., 2017), con el fin de establecer condiciones basales de replicación. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *dxs* fueron: F 5'-TGA AAG GCC CGC AGT TC-3' y R 5'-GGC AAA CAA CCG CTG G-3', con un tamaño de amplicon de 120 pb. diseñado para este estudio. El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo utilizando el programa DNAMAN v5.2.2.

Para el ensayo de qPCR punto final, se utilizó un kit comercial (Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) Thermo Fisher®), siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones de amplificación para la qPCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento a 57 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos, durante 30 ciclos. Estas condiciones fueron las mismas para los genes evaluados, los cuales fueron *dxs*, *stx1* y *tail*.

Para verificar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, se evaluaron dos aspectos: 1) la presencia de un único amplicón del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8%, a 70 V y 200 mA durante 50 minutos; y 2) la detección de un único pico de amplificación, indicativo de un solo producto específico, mediante el análisis de curvas de disociación (*melting curve*) en PCR en tiempo real (Hajeri y Yokomi, 2022). Las condiciones de la curva de disociación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 segundos, seguida de una curva de melting de 50 °C a 95 °C, con incrementos de 0.5 °C por ciclo cada 5 segundos.

Asimismo, la eficiencia de los cebadores se determinó mediante la construcción de una curva estándar a partir de cinco diluciones seriadas (1:10) de un producto de PCR purificado, iniciando a partir de una concentración de 100 ng/μL. La eficiencia de amplificación se calculó con base en la pendiente de la curva, obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2) de 0.98, lo que indica una alta linealidad y confiabilidad del ensayo (Hajeri y Yokomi, 2022).

Análisis estadístico. A partir de los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de inducción con mitomicina C y bajo las distintas condiciones de inducción con líquido ruminal, se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con un valor de $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.001$ y $***p \leq 0.0001$.

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar las varianzas entre las cepas en función del tiempo, seguido de una prueba post hoc de Tukey. Además, se efectuó una comparación de medias entre tratamientos para cada cepa mediante una prueba *t* de Student.

El análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se llevaron a cabo utilizando RStudio v4.4.1 (Posit team, 2024), empleando las librerías reshape2 v1.4.4, ggplot2 v3.5.1, dplyr v1.1.4, gridExtra v2.3, lsr v0.5.2 y patchwork v1.2.1. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con un valor de $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.001$ y $***p \leq 0.0001$.

Para los análisis de qPCR, se realizó una cuantificación absoluta de copias genómicas de los amplicones de *stx1* y *tail*, a partir de los valores en ng/μL obtenidos de la transformación de los valores ct mediante las curvas de estandarización de la qPCR. Este valor es inversamente proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias genómicas} = \frac{(\text{concentración DNA (ng/}\mu\text{L)} \times [6.022 \times 10^{23}])}{\text{largo del amplicón (bp)} \times [1 \times 10^9] \times 650}$$

(Starocik, 2004)

Esto con la finalidad de evaluar el número de copias genómicas de partículas virales presentes en el sobrenadante, posteriormente se calcularon las medias correspondientes.

Adicionalmente, se realizó una cuantificación relativa con el objetivo de determinar los cambios en el número de copias de los genes *tail* y *stx1* en la cepa de *E. coli* PGV tratada con distintas condiciones de líquido ruminal. Esta cuantificación se llevó a cabo a partir del ADN bacteriano utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Lee y colaboradores (2008), empleando como gen de referencia *dxs* (Lee et al., 2008; Plotka et al., 2017). Estos cálculos se realizaron utilizando Python 3.12.4 (Python Software Foundation, 2024), empleando las librerías Pandas v2.3.3 y NumPy v2.4.0.

Secuenciación y análisis genético. El ADN de los bacteriófagos obtenido a partir de los sobrenadantes tras la inducción con mitomicina C fue secuenciado en la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México, utilizando la plataforma Illumina NextSeq 500 y con un rendimiento de 500 ciclos, con una muestra cuya concentración mínima fuese 4 ng/μL ADN en un volumen total de 15 μL.

A partir de las bibliotecas generadas, se evaluó la calidad de la secuenciación para seleccionar lecturas con valores superiores a Q30. Asimismo, se analizaron parámetros como el contenido de GC, la sobrerrepresentación de secuencias y la longitud de las lecturas. Esta evaluación se realizó utilizando el programa FastQC v0.12.0 (de Sena Brandine y Smith, 2019). Para la eliminación de secuencias duplicadas se utilizó bbmap v39.81 (Bushnell, 2017), sin embargo, no se considera necesario la eliminación de todas las deduplicaciones, ya que, en estudios metagenómicos, la eliminación indiscriminada de lecturas duplicadas puede conducir a una subestimación de la abundancia biológica real, ya que una proporción de estas corresponde a duplicados naturales derivados de la cobertura y dinámica poblacional (Niu et al., 2010; Zhang et al., 2023).

La eliminación de adaptadores de Illumina presentes en las secuencias (F: CCTACGGGNGGCWGCAG; R: GACTACHVGGGTATCTAATCC), así como el recorte de bases de baja calidad (trimming), se llevó a cabo utilizando el programa Trimmomatic v.0.36. (Bolger, 2014). Posteriormente, el ensamblaje de los genomas se realizó mediante

los programas SPAdes v2.4.0, donde se buscó coberturas 30x, *k-mer* de tamaño 21, 33, 55, 61 y 77 por la presencia de secuencias repetidas (Prjibelski et al., 2020) y metaSPAdes v.3.15.3 (Nurk et al., 2017).

Para evaluar si las secuencias obtenidas tienen el mínimo permitido de 1% de contaminación de ADN bacteriano se utilizó ViromeQC v1.0.2 (Zolfo et al., 2019)

Para la identificación de genes de virulencia se utilizó el programa ABRicate GPLv2 (Seemann, 2023), empleando como referencias las bases de datos VFDB (Chen et al., 2016) y Ecoli_VF (Ingle et al., 2016).

Adicionalmente, se construyó una base de datos personalizada de genes asociados a proteínas de bacteriófagos, siguiendo las instrucciones del programa ABRicate. Para ello, se generó un archivo en formato FASTA que incluyó secuencias de nucleótidos correspondientes a genes de bacteriófagos previamente reportados. Las secuencias se obtuvieron a partir de la selección de 100 genomas completos que contarán con anotación genómica, de los cuales se recuperaron las secuencias codificantes (CDS) de cada gen.

Posteriormente, las secuencias se integraron en un archivo FASTA, en el que se incluyó la siguiente información en el encabezado de cada secuencia: nombre de la base de datos (DB; en este caso, proteinafagos), identificador del gen (ID), número de acceso en GenBank (ACC), campo "RESISTANCES", utilizado en este caso para indicar el bacteriófago en el que se encuentra el gen, y una breve descripción del gen (DESC).

```
> cd /path/to/abricate/db
> mkdir proteinafagos
> cp /path/to/proteinafagos.fasta sequences
> head -n 1 sequences
> proteinafagos~~~ID~~~ACC~~RESISTANCES~~DESC
> abricate --setupdb
> # or just do this: makeblastdb -in sequences -title proteinafagos -dbtype nucl -hash_index
> abricate --list
```

La búsqueda de secuencias relacionadas con bacteriófagos se realizó utilizando FastViromeExplorer v1.3, para lo cual se ocuparon los parámetros preestablecidos, se analizaron lecturas pareadas en formato fastq y el índice generado fue a partir de la base de dato "ncbi-viruses-list.txt", según las instrucciones del programador (Tithi et al., 2018).

Resultados

Inducción de cepas de *E. coli* PGV con mitomicina C

Las nueve cepas de *E. coli* PGV, cultivadas por triplicado ($n = 3$) en caldo Luria-Bertani (LB), presentaron un comportamiento homogéneo durante la cinética de crecimiento de 12 horas, evidenciado por un incremento progresivo en la absorbancia medida por espectrofotometría, asociado al aumento en la densidad óptica (OD₆₀₀) a lo largo del tiempo (Cuadro 1 suplementario, Figura 1).

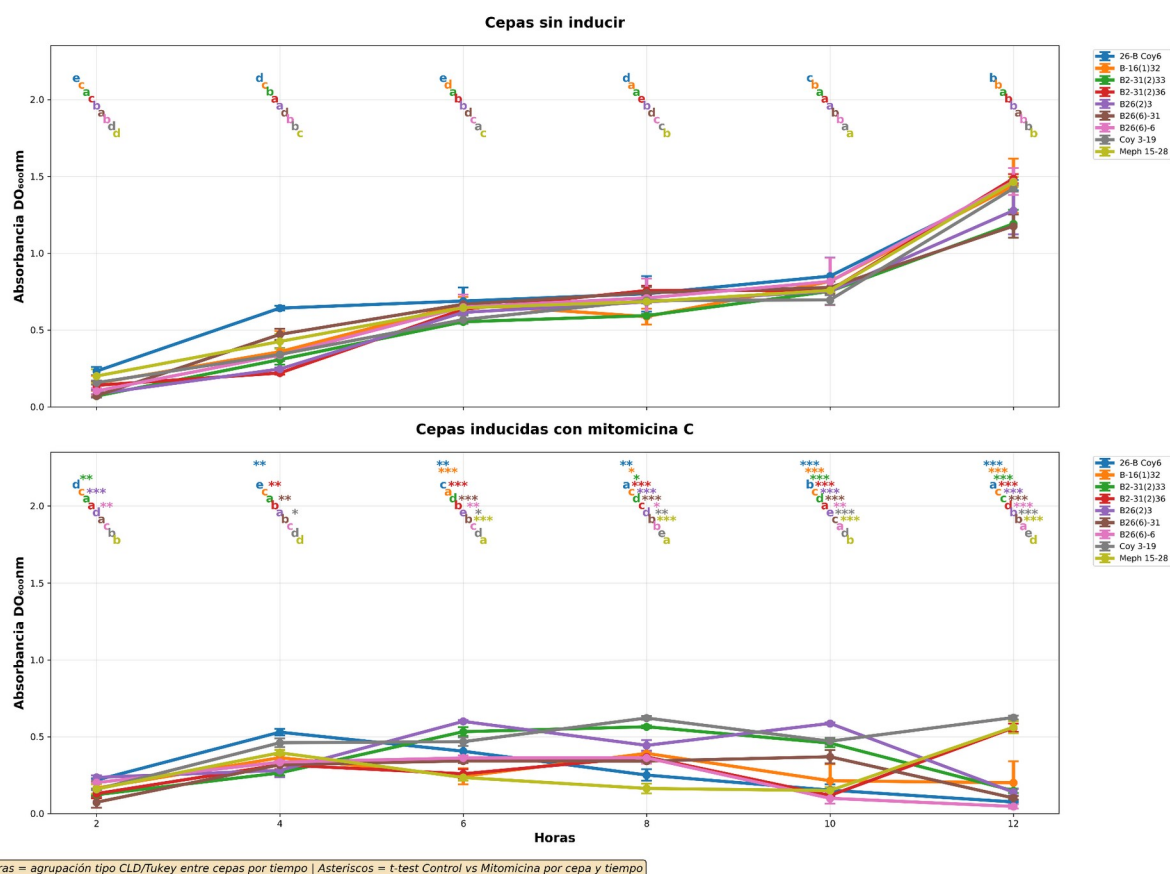


Figura 1. Cinética de crecimiento de las nueve cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C. (A) Crecimiento en medio LB sin inducción (Control). (B) Crecimiento en presencia de mitomicina C. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$) de la absorbancia a 600 nm (DO_{600}) a lo largo de 12 horas, para cada cepa sin inducir e inducidas con mitomicina C. Las letras indican diferencias significativas entre cepas (diferenciadas por color) en cada tiempo de muestreo (ANOVA de dos vías), mientras que los asteriscos por color de cepa indican diferencias significativas entre tratamientos (control vs. mitomicina C) para cada cepa en tiempos específicos (prueba t de Student). Los niveles de significancia se representan como $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$.

No obstante, se observaron variaciones en los valores promedio de absorbancia entre las cepas en distintos tiempos de incubación. Por ello, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de una prueba de Tukey, con el fin de evaluar la existencia de diferencias significativas entre las nueve cepas en cada intervalo de tiempo (Cuadro 3).

A las 2 horas, las medias de OD_{600} oscilaron entre 0.071 y 0.273, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), destacando las cepas 26-B Coy 6 ($DE \pm 0.027$) y B-16(1)32 ($DE \pm 0.149$) (Cuadro 3). A las 4 horas, los valores de OD_{600} variaron entre 0.221 y 0.643, manteniéndose diferencias significativas ($p < 0.0001$), particularmente en las cepas 26-B Coy 6, B2-31(2)36 y B26(2)3 (Cuadro 3).

A las 6 horas, los valores se situaron entre 0.554 y 0.689, observándose aún diferencias significativas ($p = 0.0196$), siendo la cepa 26-B Coy 6 la que presentó mayor variación (Cuadro 3). En contraste, a partir de las 8 horas (rango: 0.588–0.757), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($p = 0.0718$). De manera similar, a las 10 horas (0.696–0.851; $p = 0.1932$) y a las 12 horas (1.191–1.466; $p = 0.0587$), no se observaron diferencias significativas entre los grupos (Cuadro 3, Figura 1).

Estos resultados muestran que las nueve cepas de *E. coli* PGV crecidas en LB podrían empezar con variaciones en su OD_{600} , pero al finalizar una cinética de 12 horas muestran un comportamiento homogéneo sin mostrar variaciones estadísticamente significativas (Cuadro 3, Figura 1).

Una vez establecido el comportamiento de crecimiento en condiciones normales, se evaluó la cinética de crecimiento en presencia de mitomicina C (Cuadro 3, Figura 1).

A las 2 horas postinducción, los valores de OD₆₀₀ oscilaron entre 0.074 y 0.236, observándose diferencias estadísticamente significativas entre las cepas ($p < 0.0001$), destacando la cepa B26(6)31. A las 4 horas postinducción, los valores de OD₆₀₀ se ubicaron entre 0.265 y 0.530, manteniéndose diferencias significativas ($p < 0.0001$), particularmente en las cepas 26-B Coy 6 (DE ± 0.022) y Coy 3-19 (DE ± 0.027), en comparación con el resto (Cuadro 3, Figura 1).

A las 6 horas, los valores oscilaron entre 0.235 y 0.600, donde las cepas B26(2)-3 (DE ± 0.008) y B2-31(2)33 (DE ± 0.029) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$). A las 8 horas postinducción, los valores de OD₆₀₀ variaron entre 0.164 y 0.565, observándose diferencias significativas entre cepas ($p < 0.0001$), destacando Coy 3-19 (DE ± 0.012), 26-B Coy 6 (DE ± 0.038), B2-31(2)33 (DE ± 0.010) y Meph 15-28 (DE ± 0.032) (Cuadro 3, Figura 1).

A las 10 horas postinducción, los valores oscilaron entre 0.100 y 0.587, donde las cepas B26(2)3 (DE ± 0.007) y B26(6)6 (DE ± 0.035) mostraron diferencias significativas ($p < 0.0001$). Finalmente, a las 12 horas postinducción, los valores de OD₆₀₀ se ubicaron entre 0.047 y 0.625, manteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$), particularmente en las cepas Coy 3-19 (DE ± 0.012), Meph 15-28 (DE ± 0.040) y B2-31(2)36 (DE ± 0.027) (Cuadro 3, Figura 1).

Estos resultados indican que las nueve cepas respondieron de manera diferente a la presencia de mitomicina C y no mostraron un crecimiento homogéneo al finalizar la cinética a las 12 horas postinducción (Cuadro 3, Figura 1). Por lo tanto, se realizó una comparación de medias entre tratamientos mediante una prueba *t* de Student, en la cual se compararon las medias de cada tratamiento en cada tiempo evaluado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias de las absorbancias (OD₆₀₀) entre tratamientos control y mitomicina para 9 cepas bacterianas en las 12 horas de incubación (N = 432 observaciones, n = 3 réplicas por grupo). Prueba: t de Student independiente (df = 5). Diferencias significativas * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ y * $p \leq 0.0001$**

Cepa	Tiempo	t-student	p-valor
26-B Coy 6	2	0.78	0.4257
	4	1.88	0.1334
	6	5.61	0.005*
	8	8.02	0.0013*
	10	9.91	0.0006**
	12	68.8	0.0001***
B16(1)32	2	0.92	0.412
	4	1.45	0.234
	6	7.23	0.0021*
	8	6.89	0.0028*
	10	7.45	0.0018*
	12	15.2	0.0001***
B2-31(2) 33	2	-3.12	0.089

	4	-0.45	0.673
	6	1.23	0.289
	8	5.67	0.0042*
	10	9.87	0.0007**
	12	12.3	0.0001***
B2-31-(2)36	2	0.59	0.5896
	4	3.52	0.0244
	6	17.1	0.0001***
	8	12.8	0.0002**
	10	105.8	0.0001***
	12	40.9	0.0001***
B26(2)3	2	0.68	0.5352
	4	1.05	0.3534
	6	1.41	0.2314
	8	7.94	0.0014*
	10	16.65	0.0001***
	12	12.7	0.0003**
B26(6)31	2	1.62	0.1813
	4	9.76	0.0006**
	6	11.2	0.0004**
	8	11.8	0.0003**
	10	9.45	0.0008**
	12	28.4	0.0001***
B26(6)6	2	-5.23	0.0321
	4	0.23	0.834
	6	4.89	0.0089*
	8	5.67	0.0042*
	10	8.12	0.0015*
	12	32.1	0.0001***
Coy 3-19	2	0.09	0.934
	4	-0.45	0.678
	6	2.34	0.098
	8	3.45	0.028*
	10	6.78	0.0029*
	12	14.8	0.0001***
Meph 15-28	2	1.23	0.289
	4	2.34	0.098
	6	15.6	0.0001***

	8	18.9	0.0001***
	10	13.2	0.0001***
	12	18.4	0.0001***

El análisis comparativo de las medias de las OD₆₀₀ mostró una diferencia significativa entre las cepas crecidas sin inducir y las cepas inducidas con mitomicina C a partir de las 4 horas postinducción, para el caso de la cepa B26(6)-31 con un valor de $t = 4.89$ y una $p = 0.0089$ ($*p \leq 0.05$) (Cuadro 4). A las 6 horas seis de las nueve cepas, presentaron una diferencia estadísticamente significativa, las cepas fueron 26-B Coy 6 con un $t=5.61$ y un $p=0.005$ ($*p \leq 0.05$), B2-31-(2)36 con una $t=17.1$ y un $p=0.0001$ ($***p \leq 0.0001$), B26(6)-31 con una $t = 11.2$ y una $p = 0.0004$ ($**p \leq 0.0001$), B26(6)6 con una $t = 4.89$ y una $p = 0.0089$ ($*p \leq 0.05$), Meph 15-28 con una $t = 15.6$ y una $p = 0.0001$ ($***p \leq 0.0001$) (Cuadro 4). Observando una disminución en las absorbancias en las cepas tratadas con mitomicina C en comparación con las cepas sin tratar (Figura 1).

A las 8, 10 y 12 horas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas inducidas con mitomicina C y aquellas sin inducción en las nueve cepas evaluadas.

A las 8 horas, todas las cepas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), con valores de t que oscilaron entre 3.45 y 68.02, destacando la cepa 26B-Coy 6 ($t = 68.02$; $p = 0.0013$) y Meph 15-28 ($t = 18.9$; $p = 0.0001$) (Cuadro 4, Figura 1).

A las 10 horas, se mantuvieron diferencias significativas en todas las cepas ($p < 0.01$), con valores de t entre 6.78 y 105.8. La cepa B2-31(2)36 presentó el valor más alto ($t = 105.8$; $p = 0.0001$), seguida de B26(2)-3 ($t = 16.65$; $p = 0.0001$) y Meph 15-28 ($t = 13.2$; $p = 0.0001$) (Cuadro 4, Figura 1).

A las 12 horas, las diferencias se acentuaron en todas las cepas ($p \leq 0.001$), con valores de t entre 12.3 y 68.8. Destacaron las cepas 26B-Coy 6 ($t = 68.8$; $p = 0.0001$), B26(6)6 ($t = 32.1$; $p = 0.0001$) y B26(6)31 ($t = 28.4$; $p = 0.0001$) (Cuadro 4, Figura 1).

En conjunto, estos resultados evidencian que la inducción con mitomicina C genera un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.001$) sobre la cinética de crecimiento bacteriano a partir de las 4 horas, el cual se vuelve más evidente en la mayoría de las cepas en tiempos posteriores (Cuadro 4, Figura 1). Este cambio en la cinética de crecimiento podría estar asociado tanto a una modificación en la tasa de proliferación bacteriana como a la activación de mecanismos de lisis celular, consistentes con procesos de inducción lítica mediados por bacteriófagos.

Asimismo, se observa que la respuesta al tratamiento con mitomicina C no es homogénea entre las cepas, ya que algunas presentan variaciones en su crecimiento estadísticamente significativas ($p \leq 0.001$), mientras que otras cepas muestran un declive en su densidad bacteriana (Figura 1, Cuadro 1).

Debido a esto, se planteó la posibilidad de que en el sobrenadante exista la presencia de partículas virales, bacteriófagos, resultado de la inducción con mitomicina C.

Detección de genes asociados a bacteriófagos en sobrenadantes de cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C

Al haber observado una disminución en la densidad bacteriana de las cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C (Figura 1), comportamiento característico de la inducción de bacteriófagos, se infiere que dicha reducción corresponde a un proceso de lisis bacteriana.

En consecuencia, se asume que en el sobrenadante se encuentran presentes partículas virales (bacteriófagos), por lo que se procedió a su detección mediante la amplificación de genes asociados a bacteriófagos por PCR.

De las nueve cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C se recuperaron los bacteriófagos presentes en los sobrenadantes, los cuales fueron previamente filtrados, y se realizó la extracción de ADN. En los sobrenadantes de las nueve cepas inducidas se detectó la presencia de genes asociados a bacteriófagos, incluyendo *stx2*, *tail*, *terminase* y *holin* (Cuadro 5).

Los genes *tail*, *terminase*, *capsid* y *holin* se detectaron en los nueve sobrenadantes analizados (Cuadro 5). El gen *stx2* únicamente se identificó en los sobrenadantes correspondientes a aquellas cepas que previamente habían resultado positivas para este gen durante su caracterización genética (Cuadro 1). Lo que podría respaldar que la lisis bacteriana observada (Figura 1) puede estar asociada a la inducción de bacteriófagos.

Cuadro 5. Detección de genes asociados a bacteriófagos mediante PCR de punto final. Se determinó la presencia de genes asociados a bacteriófagos en sobrenadantes recuperados y filtrados de cepas inducidas con mitomicina C. Los genes analizados y el tamaño de sus amplicones fueron: *stx2* (325 pb), *tail* (189 pb), *terminase* (178 pb), *capsid* (300 pb) y *holin* (344 pb).

Sobrenadante de las cepas <i>E. coli</i> PGV inducidas con Mitomicina	<i>stx2</i> 325 pb	<i>tail</i> 189 pb	<i>terminase</i> 178 pb	<i>capsid</i> 300 pb	<i>holin</i> 344 pb
26B-Coy 6	+	+	+	+	+
Coy 3-19	+	+	+	+	+
Meph 15-8	-	+	+	+	+
B16(1)32	+	+	+	+	+
B26(2)3	-	+	+	+	+
B26(6)6	-	+	+	+	+
B26(6)31	-	+	+	+	+
B2-31(2)33	+	+	+	+	+
B2-31(2)36	+	+	+	+	+

Secuenciación y análisis genómico del sobrenadante de la cepa 26B-Coy 6 inducida con mitomicina C

Una vez confirmada la presencia de bacteriófagos en el sobrenadante mediante la amplificación de genes asociados a estos (Cuadro 5), se realizó una secuenciación con el objetivo de corroborar la inducción y liberación de bacteriófagos que podrían portar el gen *stx2* en su genoma, además de evaluar la presencia de genes asociados a proteínas de bacteriófagos, evaluar la presencia de distintos bacteriófagos y conocer sus características genéticas.

Se seleccionó una cepa de *E. coli* PGV en la cual se observó la inducción de bacteriófagos, lisis completa tras el tratamiento con mitomicina C, con presencia de *stx2* y que no hubiese sido aislada de rumiantes, pero compartiera genes de virulencia relacionados a cepas STEC (*stx1* y *stx2*) aisladas de rumiantes. La cepa que cumplió con estos criterios fue la cepa 26B-Coy 6, aislada de un carnívoro, cuyo genoma contiene los genes *stx1* y *stx2*, lo que permite clasificarla como una cepa STEC.

La cepa 26B-Coy 6 fue cultivada nuevamente en caldo LB e inducida con mitomicina C tras dos horas de crecimiento. Una vez observado el fenómeno de reducción de su densidad

poblacional que asociamos a la lisis bacteriana, se recuperaron los bacteriófagos presentes en el sobrenadante, se extrajo el ADN, recuperando 20 µL con una concentración de 4 ng/µL, posteriormente se envió para su secuenciación.

Se obtuvo un total de 22,552,172 lecturas, las secuencias obtenidas presentaron una longitud de lectura de 149 pb, con valores de calidad superiores entre Q20 y Q30 (Archivos adjuntos Fastqc_no_procesada y Fastqc_limpieza), así como un contenido de GC de 49, los porcentajes de deduplicado estuvieron entre un 11% al 13% (Cuadro 6).

Posteriormente se realizó un depurado de las secuencias, obteniendo un total de 8,521,641 secuencias Con calidades superiores a Q30, porcentajes de GC de 50, Longitudes promedios de secuencia entre 142.87pb y 143.69pb y porcentajes de secuencias deduplicadas entre 8.02% y 8.22% (Cuadro 6). Una vez depuradas las secuencias, evaluamos el porcentaje de contaminación bacteriana con ViromeQC v1.0.2, nuestro resultado fue 0.24%, el cual es menor a lo permitido de 1% para la evaluación de muestras virales (Zolfo et al., 2019). Por lo cual realizamos el procesamiento y análisis de datos de secuencias de bacteriófagos.

Cuadro 6. Parámetros de calidad de la secuenciación de la cepa 26B-Coy 6 obtenida mediante plataforma Illumina NextSeq 500. Se presentan las métricas de calidad antes y después del proceso de depuración de lecturas, incluyendo número total de secuencias, secuencias de baja calidad, longitud de secuencia, contenido de GC, porcentaje de secuencias deduplicadas y longitud promedio de lectura para archivos *paired-end* (R1 y R2). El análisis de calidad previo al depurado se realizó con *FastQC* v0.12.0, mientras que el filtrado y procesamiento de las lecturas se llevaron a cabo con *bbmap* v39.81 y *Trimmomatic* v0.36.

Secuencias antes de depurara						
Nombre de archivo	Total de secuencias	Secuencias de baja calidad	Longitud de secuencia	%GC	% Deduplicado total	Longitud promedio de secuencia
26_B_Coy_6_S1_R1_001.fastq.gz	22552172	0	149	49	11.84	149
26_B_Coy_6_S1_R2_001.fastq.gz	22552172	0	149	49	13.53	149
Secuencias posterior al depurado						
Nombre de archivo	Total de secuencias	Secuencias de baja calidad	Longitud de secuencia	%GC	% Deduplicado total	Longitud promedio de secuencia
26_B_Coy_6_S1_R1_001.fastq.gz	8521641	0	120-149	50	8.019949171	143.69
26_B_Coy_6_S1_R2_001.fastq.gz	8521641	0	120-149	50	8.218881076	142.87

Las secuencias depuradas fueron ensambladas y se obtuvo un total de 17,199 secuencias contiguas (contigs), con valores de N50 de 4,474 y L50 de 254, indicando el tamaño de la secuencia contigua más corta y el número de secuencias contiguas necesarias para cubrir el 50% de la longitud total, respectivamente. Además, presentan una exhaustividad de 0.99 (el 99 % de las secuencias están representadas en el ensamblaje), una redundancia de 1.092 (bases representadas en el genoma) y la presencia de 103 marcadores en las secuencias contiguas (Cuadro 7).

Las métricas de este ensamblaje indican que las secuencias ensambladas son de buena calidad y la existencia de variabilidad genética entre ellas (Cuadro 7) (Wang, 2020).

Cuadro 7. Métricas del ensamblaje generado con *metaSPAdes* a partir de las secuencias obtenidas tras la inducción de bacteriófagos en la cepa *E. coli* 26B-Coy 6. Se presentan los parámetros de calidad del ensamblaje, incluyendo longitud total, contenido de GC, número de marcadores presentes, exhaustividad, redundancia, número de secuencias contiguas (contigs), así como los valores de N50 y L50. El ensamblaje se realizó utilizando los parámetros predeterminados del programa *metaSPAdes*.

Nombre del archivo	Largo	Contenido de GC	Marcadores Presentes	Exhaustividad	Redundancia	Secuencias contiguas	N50	L50
26_B_Coy6_metaespa_des_scaffolds_1	5,204,031	49.17	103	0.9905	1.092	17,199	4,774	254

Una vez aplicados los filtros de calidad, se realizó la búsqueda de genes asociados a bacteriófagos utilizando un índice específico de proteínas de bacteriófagos generado en ABRicate (Cuadro 8). Se identificaron inicialmente 660 genes asociados a bacteriófagos. Tras un proceso de depuración, se seleccionaron únicamente aquellos genes con valores de cobertura y similitud superiores al 50% y con una función descrita, debido a la alta diversidad genética que pueden presentar estas secuencias (Yang et al., 2025). En total, se detectaron 177 genes codificantes de proteínas asociadas a bacteriófagos. De estos, 9 genes se encontraban en un rango de cobertura de 50–59%, 12 genes en un rango de 60–69%, 13 genes en un rango de 70–79%, 11 genes en un rango de 80–89% y 132 genes en un rango de 90–100% de cobertura (Cuadro 8).

Cuadro 8. Genes asociados a proteínas de bacteriófagos detectados en el sobrenadante de la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6 tras la inducción con mitomicina C. La identificación se realizó con ABRicate GPLv2 utilizando la base de datos “proteinafagos”. Se reportan genes con cobertura $\geq 50\%$ y similitud $\geq 50\%$, correspondientes a proteínas estructurales, de lisis-lisogenia y asociadas a defensa bacteriana.

Muestra	Cobertura	Similitud	Genes que codifican para proteínas de fagos
26-B Coy 6	100	98.53	DNA-packaging protein
26-B Coy 6	100	93.16	lysis protein
26-B Coy 6	100	100	bacteriocin
26-B Coy 6	100	100	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	100	99.7	LPD5 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	99.89	DUF551 domain-containing protein

26-B Coy 6	100	100	ead/Ea22-like family protein
26-B Coy 6	100	100	DUF4752 family protein
26-B Coy 6	100	100	TraR/DksA family transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	100	antirepressor Ant
26-B Coy 6	100	99.65	antA/AntB antirepressor family protein
26-B Coy 6	100	100	site-specific integrase
26-B Coy 6	100	100	DUF4222 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	100	YqaJ viral recombinase family protein
26-B Coy 6	100	99.75	recombination protein Bet
26-B Coy 6	100	99.66	host-nuclease inhibitor Gam family protein
26-B Coy 6	100	98.83	exodeoxyribonuclease VIII
26-B Coy 6	100	98.45	hypothetical protein
26-B Coy 6	100	98.2	cell division protein FtsZ
26-B Coy 6	100	100	antitermination protein N
26-B Coy 6	100	100	helix-turn-helix transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	99.19	ATP-binding protein
26-B Coy 6	100	99.35	DUF1627 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	100	DUF977 family protein
26-B Coy 6	100	98.67	DUF4145 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	97.56	hypothetical protein
26-B Coy 6	100	98.38	helix-turn-helix transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	99.62	type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin
26-B Coy 6	100	99.32	antirepressor antB
26-B Coy 6	100	100	ORF6N domain-containing protein
26-B Coy 6	100	100	recombination protein NinB
26-B Coy 6	100	100	DUF1364 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	99.72	RusA family crossover junction endodeoxyribonuclease

26-B Coy 6	100	100	protein ninH
26-B Coy 6	100	97.9	antitermination protein Q
26-B Coy 6	100	100	Shiga toxin Stx1 subunit A
26-B Coy 6	100	100	Shiga toxin Stx1a subunit B
26-B Coy 6	100	99.23	SASA family carbohydrate esterase
26-B Coy 6	100	98.97	lysis protein holin
26-B Coy 6	100	99.25	lysozyme
26-B Coy 6	100	100	putative antirepressor protein
26-B Coy 6	100	100	lysis protein
26-B Coy 6	100	100	Rha family transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	100	terminase
26-B Coy 6	100	99.65	terminase
26-B Coy 6	100	99.67	portal protein
26-B Coy 6	100	99.5	hypothetical protein
26-B Coy 6	100	98.03	N4-gp56 family major capsid protein
26-B Coy 6	100	100	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	100	99.02	helix-turn-helix domain-containing protein
26-B Coy 6	100	99.04	ash family protein
26-B Coy 6	100	99.64	hypothetical protein
26-B Coy 6	100	95.26	LexA family transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	98.42	DUF2303 family protein
26-B Coy 6	100	95.72	5'-deoxynucleotidase
26-B Coy 6	100	95.98	DinI-like family protein
26-B Coy 6	100	87.5	Ail/Lom family outer membrane beta-barrel protein
26-B Coy 6	100	96.73	tail assembly protein
26-B Coy 6	100	93.95	C40 family peptidase
26-B Coy 6	100	96.28	minor tail protein L
26-B Coy 6	100	93.03	tail protein

26-B Coy 6	100	98.16	tail assembly protein T
26-B Coy 6	100	95.98	tail protein
26-B Coy 6	100	96.49	minor tail U family protein
26-B Coy 6	100	97.75	tail protein
26-B Coy 6	100	98.05	terminase small subunit
26-B Coy 6	100	94.78	lysozyme RrrD
26-B Coy 6	100	98.26	Bor protein precursor
26-B Coy 6	100	99.54	excisionase
26-B Coy 6	100	98.32	tyrosine-type recombinase/integrase
26-B Coy 6	100	90.36	GtrA family protein
26-B Coy 6	100	96.41	YmfQ family protein
26-B Coy 6	100	98.21	baseplate J/gp47 family protein
26-B Coy 6	100	99.3	GP46 family protein
26-B Coy 6	100	98.54	baseplate assembly protein V
26-B Coy 6	100	98.33	baseplate protein
26-B Coy 6	100	98.33	DNA circularization N-terminal domain-containing protein
26-B Coy 6	100	98.8	tail tape measure protein
26-B Coy 6	100	99.07	tail assembly protein
26-B Coy 6	100	96.64	tail tube protein
26-B Coy 6	100	98	tail sheath subtilisin-like domain-containing protein
26-B Coy 6	100	98.83	DUF2635 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	96.84	head closure protein
26-B Coy 6	100	99.38	head-tail connector protein
26-B Coy 6	100	98.01	hypothetical protein
26-B Coy 6	100	98.76	major capsid protein
26-B Coy 6	100	99.85	HK97 family prohead protease
26-B Coy 6	100	98.47	portal protein

26-B Coy 6	100	97.27	putative integral membrane protein
26-B Coy 6	100	97.12	terminase large subunit
26-B Coy 6	100	98.79	terminase small subunit P27 family
26-B Coy 6	100	91.45	HNH endonuclease
26-B Coy 6	100	89.82	DUF2570 domain-containing protein
26-B Coy 6	100	93.5	glycoside hydrolase family protein
26-B Coy 6	100	95.11	holin lambda family
26-B Coy 6	100	99.26	helix-turn-helix domain-containing protein
26-B Coy 6	100	97.28	protein Ymfl
26-B Coy 6	100	98.08	helix-turn-helix transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	99.42	helix-turn-helix domain-containing protein
26-B Coy 6	100	98.89	Shiga toxin Stx2c subunit B
26-B Coy 6	100	99.02	KilA-N domain-containing protein
26-B Coy 6	100	99.39	LexA family transcriptional regulator
26-B Coy 6	100	97.4	N-6-adenine-methyltransferase
26-B Coy 6	100	87.64	lysozyme
26-B Coy 6	100	96.55	antitermination protein
26-B Coy 6	99.88	96.37	tail tape measure protein
26-B Coy 6	99.81	98.69	putative envelope protein
26-B Coy 6	99.78	97.4	proendopeptidase RzpD
26-B Coy 6	99.7	77.95	tail protein
26-B Coy 6	99.54	93.15	DUF4014 family protein
26-B Coy 6	99.5	99.5	helix-turn-helix domain-containing protein
26-B Coy 6	99.45	99.17	DNA-binding protein
26-B Coy 6	99.45	91.21	HNH endonuclease
26-B Coy 6	99.29	96.43	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	99.23	76.54	glycosyltransferase family 2 protein
26-B Coy 6	98.75	89.98	phosphoadenosine phosphosulfate reductase family protein

26-B Coy 6	98.35	76.58	minor tail protein G
26-B Coy 6	98.29	93.04	hypothetical protein
26-B Coy 6	98.25	88.39	replication initiation protein
26-B Coy 6	97.87	94.33	minor tail protein G
26-B Coy 6	97.62	97.05	KilA-N domain-containing protein
26-B Coy 6	97.55	99.06	head-tail connector protein
26-B Coy 6	97.16	86.86	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	96.92	86.98	hypothetical protein
26-B Coy 6	96.78	80.53	tail protein
26-B Coy 6	96.71	82.21	type I toxin-antitoxin system Hok family toxin
26-B Coy 6	96.4	87.38	NinE protein
26-B Coy 6	96.32	98.3	PerC family transcriptional regulator
26-B Coy 6	95.38	98.39	Rus A family crossover junction endodeoxyribonuclease
26-B Coy 6	93.88	98.08	DUF968 domain-containing protein
26-B Coy 6	91.75	78.75	site-specific integrase
26-B Coy 6	90.38	97.53	HK97 gp10 family protein
26-B Coy 6	89.99	98.16	DUF1983 domain-containing protein
26-B Coy 6	89.43	92.27	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	87.4	80.18	antitermination protein Q
26-B Coy 6	87.23	96.75	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	83.15	93.53	porin
26-B Coy 6	81.96	97.61	excisionase family protein
26-B Coy 6	81.72	86.4	porin
26-B Coy 6	81.09	100	truncated transposase
26-B Coy 6	80.8	99.01	tail assembly chaperone
26-B Coy 6	80.14	94.69	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	80	88.89	YdfR family protein
26-B Coy 6	79.95	80.62	helix-turn-helix domain-containing protein

26-B Coy 6	78.82	98.48	terminase large subunit family protein
26-B Coy 6	78.01	96.36	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	77.21	98.16	head closure protein
26-B Coy 6	76.81	95.6	gpW family protein
26-B Coy 6	74.47	91.43	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	74.47	90.48	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	73.74	98.17	CII protein
26-B Coy 6	73.46	94.36	host specificity protein J
26-B Coy 6	72.34	95.1	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	72.34	94.12	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	70.92	95	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	70.92	99	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	69.5	92.86	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	69.48	89.86	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	69.33	99.79	LexA family transcriptional repressor
26-B Coy 6	68.57	76.18	site-specific DNA-methyltransferase
26-B Coy 6	68.09	98.96	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	65.96	90.32	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	63.83	98.89	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	62.91	89.55	type I toxin-antitoxin system Hok family toxin
26-B Coy 6	62.7	94.94	bacteriocin
26-B Coy 6	61.84	85.82	DUF3950 domain-containing protein
26-B Coy 6	60.11	97.27	putative integral membrane protein
26-B Coy 6	60.04	93.64	IS3 family transposase
26-B Coy 6	59.57	89.29	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	58.87	86.75	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	58.16	90.24	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	57.45	97.53	Hok/Gef family protein

26-B Coy 6	56.58	94.86	tail fiber assembly protein
26-B Coy 6	56.23	99.48	DUF3168 domain-containing protein
26-B Coy 6	54.61	88.31	Hok/Gef family protein
26-B Coy 6	53.12	87.5	C40 family peptidase
26-B Coy 6	50.28	76.34	head-tail joining protein

Además, se realizó la identificación de las funciones de los genes. Entre los genes asociados a bacteriófagos detectados en las secuencias recuperadas del sobrenadante inducido con mitomicina C, se identificaron genes relacionados con los sistemas de lisis-lisogenia, como bacteriocinas, el represor CI, holinas y lisozimas; factores de virulencia como *stx1*, *stx2*, *eae*, componentes del sistema de secreción tipo III (SST3) y sistemas toxina-antitoxina; así como genes que codifican para proteínas estructurales correspondientes a proteínas de tallo, cola, cápside, terminasa, conector de cabeza e integrasas (Cuadro 8). Además, se observa que algunos de estos genes se reportan de forma múltiple, con diferentes coberturas y distintas similitudes de secuencia con respecto a las reportadas en GenBank, como es el caso de genes que codifican para proteínas Hok/Gef, proteína portal, proteína conectora tallo-cabeza, bactericida, proteína G de cola menor y el antirrepresor Ant, entre otras (Cuadro 8).

Estos resultados indican que la cepa de *E. coli* PGV 26B-Coy 6, tratada con mitomicina C, es capaz de liberar bacteriófagos, lo que se asocia con la disminución de la densidad bacteriana observada (Cuadro 3, Cuadro 4, Figura 1). Asimismo, la presencia de múltiples copias de distintos genes codificantes de proteínas podría indicar la presencia de distintos bacteriófagos en la cepa de *E. coli* PGV 26B-Coy 6, por lo que se realizó la búsqueda de diferentes especies de bacteriófagos en las secuencias obtenidas de la secuenciación del sobrenadante inducido con mitomicina C.

En los contigs ensamblados se realizó la búsqueda de especies de bacteriófagos presentes en la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6. En total se detectaron 24 especies de bacteriófagos con distintas abundancias en las lecturas mapeadas por FastViromeExplorer v1.2 en las secuencias pareadas, previamente depuradas, recuperados de la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6, sin embargo se realizó una depuración, seleccionando aquellas especies de bacteriófagos cuyas abundancias sean superiores al 1%, esto debido a que FastViromeExplorer v1.2 realiza un mapeo corto de coincidencia de k-mer de 31 pb, teniendo un total de 7 especies de bacteriófagos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de la presencia de bacteriófagos presentes en el sobrenadante de la cepa de *E. coli* 26B-Coy 6 inducida con mitomicina C. La identificación de especies se realizó con FastViromeExplorer v1.2 utilizando la base de datos "ncbi-viruses-list.txt". Se reportan siete especies de bacteriófagos con abundancias relativas $\geq 1\%$.

Muestra	Orden	Familia	Género	Especie	Abundancia estimada de lecturas mapeadas	Abundancia relativa en porcentajes
26-B Coy 6	Caudovirales	Podoviridae	<i>Tl2011virus</i>	<i>Shigella virus</i> VASD	6733530	52.25%
26-B Coy 6	Caudovirales	Podoviridae	<i>Pocjvirus</i>	<i>Shigella virus</i> POCJ13	3169930	24.59%

26-B Coy 6	Caudovirales	Podoviridae	<i>Pocjvirus</i>	<i>Shigella virus</i> 7502Stx	1185870	9.20%
26-B Coy 6	Caudovirales	Podoviridae	<i>TI2011virus</i>	<i>Escherichia</i> <i>virus PA2</i>	522074	4.05%
26-B Coy 6	Caudovirales	Myoviridae	<i>Unclassified</i>	<i>Shigella phage</i> <i>SfIV</i>	269048	2.09%
26-B Coy 6	Caudovirales	Siphoviridae	<i>Lambdavirus</i>	<i>Enterobacteria</i> <i>phage HK630</i>	182127	1.41%
26-B Coy 6	Caudovirales	Podoviridae	<i>Unclassified</i>	<i>Escherichia</i> <i>phage P13374</i>	167067	1.29%

Algunas de las especies de bacteriófagos mapeados en las secuencias contiguas recuperadas de los bacteriófagos inducidos de la cepa de *E. coli* PGV 26B-Coy 6 fueron *Shigella virus* VASD, con una abundancia relativas de 52.25%; *Shigella virus* POCJ13, con 24.59% de abundancia relativa; *Shigella virus* 7502Stx, con 9.20 de abundancia relativa; *Escherichia virus* PA2, con 4.05% de abundancia relativa; y *Shigella phage* SfIV, con 2.09% de abundancia relativa, entre otros (Cuadro 7).

De estos bacteriófagos se encuentran representadas 3 familias Podoviridae, Myoviridae y Siphoviridae (actualmente ya no existentes), sugiriendo la presencia de distintos bacteriófagos en la cepa de *E. coli* PGV 26B-Coy 6 (Cuadro 7).

Los bacteriófagos identificados en los distintos contigs se encuentran asociados principalmente a enterobacterias, además se asocian a bacteriófagos portadores de stx's, lo que indicaría que los bacteriófagos inducidos con mitomicina C en la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6 podrían presentar la capacidad potencial de infectar cepas de *E. coli* u otras enterobacterias.

Para descartar que las abundancias de lecturas mapeadas fuesen resultado de una subrepresentación en el mapeo de secuencias compartidas, se alineó el NODO_1, debido a que fue la secuencia contigua más larga ensamblada, con una longitud de 61,313 pb, contra las bases de datos de GenBank. El resultado mostró que el NODO_1 coincide con 3 de las 7 especies de bacteriófagos reportadas con FastViromeExplorer v1.2 (Cuadro 10).

De las especies de bacteriófagos alineadas, las que presentan mayor porcentaje de cobertura y similitud son el bacteriófago *Shigella phage* POCJ13, con una cobertura del 94% y una similitud del 97.26%, y el bacteriófago *Shigella phage* 7502 Stx, con el 91% de cobertura y una similitud del 98.92% (Cuadro 9).

Este resultado muestra que, dentro de las secuencias ensambladas, existen secuencias correspondientes a distintos bacteriófagos y que la secuencia contigua más larga no alcanza a cubrir toda la diversidad de especies, además de evidenciar la presencia de distintas familias de bacteriófagos, lo que sugiere la liberación de múltiples bacteriófagos (Cuadro 9).

Cuadro 10. Secuencia contigua NODE_1_length_61313_cov_24766.654729 alineada contra genomas de referencia del GenBank. Se presentan los mejores alineamientos obtenidos mediante BLAST, incluyendo puntuación máxima, puntuación total, porcentaje de cobertura, valor E, porcentaje de identidad y longitud de alineamiento. Se reportan únicamente secuencias correspondientes a bacteriófagos seleccionadas tras el filtrado de resultados.

Secuencia de referencia	Secuencia contigua	Puntuación máxima	Puntuación total	Porcentaje de cobertura	E value	Porcentaje de identidad	Longitud
NC_029120.1	NODO_1	39803	96310	91%	0.0	98.92%	60875

<i>Shigella phage</i> 7502 Stx, complete genome	largo 61313 pb						
FJ188381.1 <i>Stx2-converting phage</i> 1717, complete genome	NODO_1 largo 61313 pb	3788	10667	12%	0.0	92.86%	62147
NC_025434.1 <i>Shigella phage</i> POCJ13, complete genome	NODO_1 largo 61313 pb	64840	99476	94%	0.0	97.26%	62699
PV189406.1 <i>Escherichia phage</i> vB_EcoP_phi367, complete genome	NODO_1 largo 61313 pb	19139	50191	54%	0.0	96.27%	58966
NC_028685.1 <i>Shigella phage</i> Ss-VASD, complete genome	NODO_1 largo 61313 pb	19075	61535	59%	0.0	96.20%	62851
NC_049920.1 Stx1 converting phage AU5 Stx1, complete genome	NODE_1_length_61313_cov_24766.654729	18995	58913	60%	0.0	96.07%	58371

Estos resultados indican que la mitomicina C fue capaz de inducir, en la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6, bacteriófagos asociados a la movilización de genes de shigatoxinas, esto sugiere que los bacteriófagos presentes en esta cepa podrían participar en eventos de transferencia horizontal de genes mediante los ciclos de lisis-lisogenia. Por lo cual nos cuestionamos si los eventos de inducción de bacteriófagos en ambientes naturales, que favorecen la generación de nuevas variantes de cepas *E. coli* PGV con potencial capacidad patológica, estarían asociados al contacto con componentes presentes en los microambientes gastrointestinales, como podría ser el líquido ruminal, lo cual podría explicar la generación de variantes patógenas en rumiantes. Para lo cual nosotros evaluamos la inducción de bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV 26B-Coy 6 con líquido ruminal.

Inducción de la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6 con líquido ruminal

La cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6, donde se evaluó la presencia de distintos genes asociados a diferentes especies de bacteriófagos (Cuadro 7) mediante su inducción con mitomicina C, (Cuadro 8, Cuadro 9), fue desafiada con tres concentraciones de líquido ruminal (LB, LR100%, LRN100%, LRN75%, LRN50% y mitomicina C), con la finalidad de evaluar y analizar su cinética de crecimiento y la capacidad del líquido ruminal para inducir bacteriófagos, respectivamente.

La cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6, expuesta a diferentes condiciones, mostró a partir de las 2 horas, patrones de crecimiento diferenciados ($n=3$, $p < 0.05$), en comparación con la cepa control cultivada en caldo LB y con la cepa tratada con mitomicina C. A las 2 horas, las medias de OD₆₀₀ fueron para: LB, 0.448 ± 0.034 ; tratamiento con mitomicina C, 0.212 ± 0.070 ; LR100%, 0.119 ± 0.035 ; LRN50%, 0.393 ± 0.021 , LRN75%, 0.256 ± 0.010 y LRN100%, 0.132 ± 0.014 . En este tiempo, se observaron diferencias significativas entre LR100% y LB ($p = 0.0003$), LRN75% y LB ($p = 0.0007$), LRN100% y LB ($p = 0.0001$) y LRN50% y mitomicina C ($p = 0.0129$) (Figura 2).

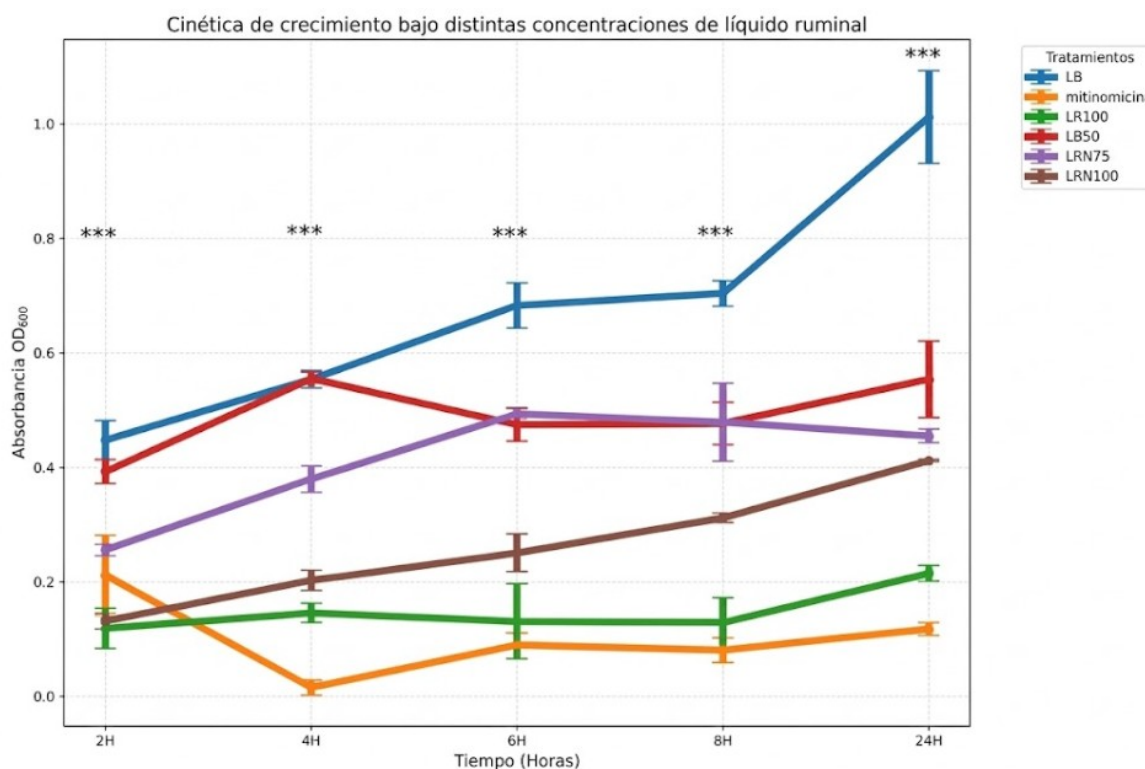


Figura 2. Curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6 bajo distintas condiciones de líquido ruminal. Se evaluó la densidad óptica (OD₆₀₀) de la cepa expuesta a líquido ruminal al 100% (LR100), 50% (LR50), 75% (LR75) y líquido ruminal nutritivo al 100% (LRN100). Como controles se utilizaron caldo Luria-Bertani (LB) y LB con mitomicina C (LB+mitomicina). En todos los tratamientos, el pH del medio se ajustó a 7.02. Los datos se presentan como la media $\pm$ DS de tres réplicas independientes ($n = 3$). El análisis de varianza (ANOVA de una vía) y prueba de *t* student, reveló diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todos los tiempos evaluados ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs LB).

A las 4 horas, los tratamientos LR100% ($p = 0.0001$) y LRN75% ($p = 0.0004$) presentaron diferencias significativas con respecto a LB. Asimismo, todos los tratamientos evaluados mostraron diferencias significativas en comparación con mitomicina C ($p \leq 0.0004$). A las 6 horas, se observaron diferencias significativas entre LR100% y LB ($p = 0.0002$), LRN75% y LB ($p = 0.0011$), LRN50% y LB ($p = 0.0017$) y LRN100% y LB ($p = 0.0001$). De igual forma, los tratamientos LRN50%, LRN75% y LRN100% mostraron diferencias significativas respecto al tratamiento con mitomicina C ($p \leq 0.0021$). A las 8 horas, todos los tratamientos evaluados presentaron diferencias significativas en comparación con LB ($p \leq 0.0055$), así como con el tratamiento con mitomicina C ($p \leq 0.0006$). Finalmente, a las 24 horas, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a ambos controles (LB y mitomicina C) ($p = 0.0001$) (Figura 2).

Las condiciones LRN75% y LRN50% mostraron patrones de crecimiento similares entre sí, particularmente a las 6 y 8 horas de incubación, sin ser estadísticamente diferentes entre sí

($p > 0.05$) (Figura 2). Sin embargo, a las 24 horas se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre ambos tratamientos (Figura 2).

La cepa tratada con LRN100% mostró una disminución en el crecimiento bacteriano en comparación con el control LB ($p \leq 0.01$), pero un crecimiento significativamente mayor que el observado en la cepa tratada con mitomicina C ($p \leq 0.01$). Este comportamiento sugiere un efecto inhibitorio parcial o una posible lisis incompleta asociada al líquido ruminal nutritivo.

Por su parte, el tratamiento con líquido ruminal sin suplementación (LR100%) presentó una limitación marcada del crecimiento desde las 2 horas postinducción, con un patrón similar al observado en la cepa tratada con mitomicina C, aunque con diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ($p < 0.001$).

En conjunto, los resultados indican que el crecimiento de la cepa *E. coli* PGV 26B-Coy 6 disminuye a diferentes concentraciones de líquido ruminal, en comparación con el control, sin generar un declive total del crecimiento (Figura 2).

Mediante un análisis de regresión lineal se evaluó si la disminución en la densidad bacteriana durante la cinética de crecimiento de 24 horas se encontraba asociada con las diferentes concentraciones de líquido ruminal empleadas en los ensayos de inducción (Figura 3). Los resultados mostraron que el modelo presentó un ajuste ($R^2 = 0.802$) y que la concentración de líquido ruminal ($p < 0.001$) tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la densidad bacteriana. En particular, la concentración mostró una asociación negativa con la absorbancia, lo que indica que a mayor concentración de líquido ruminal se observa una mayor disminución en la densidad bacteriana a lo largo del tiempo (Figura 3).

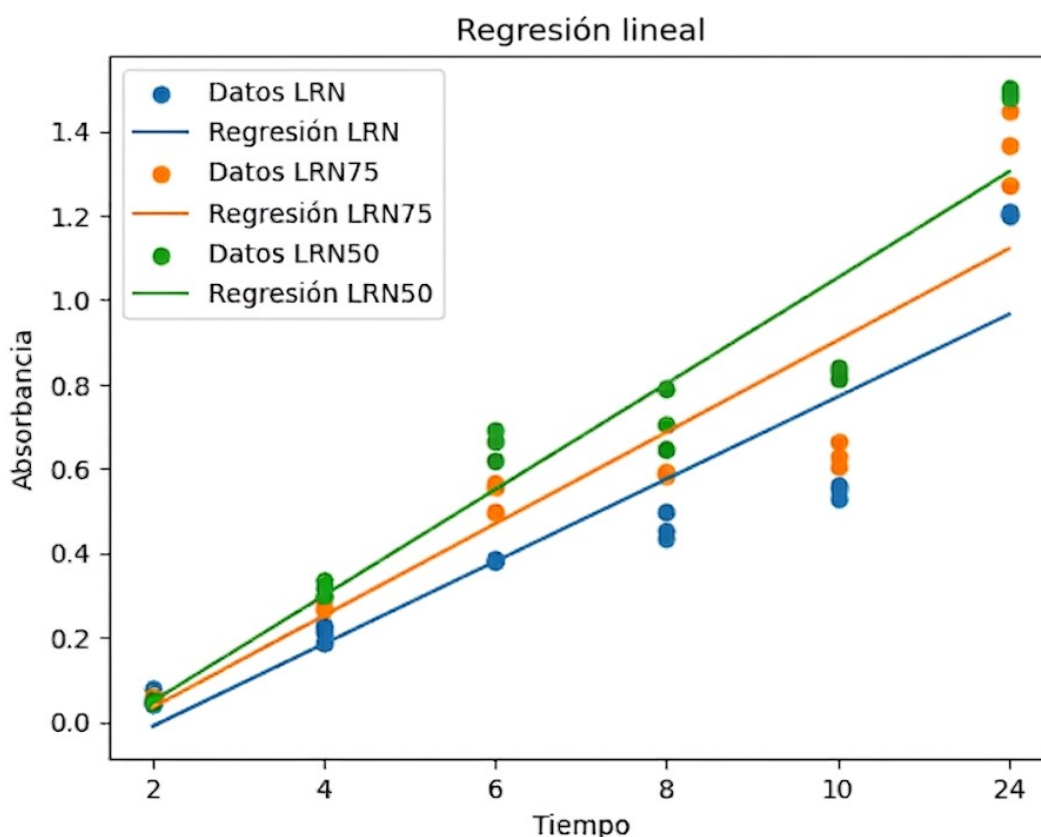


Figura 3. Regresión lineal múltiple de las absorbancias de la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6 inducida con líquido ruminal (LRN, LRN75 y LRN50). Los puntos representan los valores experimentales y las líneas los ajustes lineales correspondientes en función del tiempo. Los experimentos se realizaron por triplicado ($n=3$). Las concentraciones de líquido ruminal fueron: líquido ruminal nutritivo 100% (LRN), líquido ruminal nutritivo 75%

(LRN75) y líquido ruminal nutritivo 50% (LRN50). Se observó un efecto significativo de la concentración de líquido ruminal sobre la absorbancia ($R^2 = 0.802$, $p < 0.001$).

Este comportamiento sugiere un efecto dependiente de la concentración de líquido ruminal, incluso en condiciones de suplementación con nutrientes (Figura 3). Dicho efecto podría atribuirse a la presencia de componentes solubles en el líquido ruminal que limitan el crecimiento bacteriano o a la posible inducción parcial de bacteriófagos, los cuales restringen la proliferación bacteriana sin provocar una lisis completa, a diferencia de lo observado con la mitomicina C (Figura 2). Se evaluó la presencia de bacteriófagos en el sobrenadante como una posible causa de la disminución de la densidad bacteriana en la cinética de crecimiento.

Presencia de genes asociados a bacteriófagos por PCR punto final

A partir de los desafíos de inducción realizados con distintas concentraciones de líquido ruminal y con mitomicina C, se extrajo ADN tanto del *pellet* bacteriano como del sobrenadante. Se evaluó la presencia de los genes *stx2*, *tail*, *terminase*, *capsid* y *holin*, asociados a bacteriófagos, mediante PCR punto final. Los cinco genes se detectaron tanto en el *pellet* bacteriano como en el sobrenadante en todas las condiciones de inducción evaluadas con líquido ruminal. Asimismo, estos genes también fueron detectados en los controles de la inducción de caldo LB y caldo LB con mitomicina C (Cuadro 10).

La detección de genes asociados a bacteriófagos en el sobrenadante filtrados, previamente tratados con DNasa y RNasa antes de la extracción de ADN, podría sugerir la presencia de material genético contenido en una cápside lo que podría deberse a la liberación de partículas fágicas, inducidas con líquido ruminal. Sin embargo, debido a la presencia de estos genes en el control LB, fue necesario realizar una cuantificación de copias genómicas totales mediante PCR en tiempo real (qPCR), con el objetivo de determinar si existen diferencias cuantitativas en la inducción de genes asociados a bacteriófagos entre las distintas condiciones evaluadas, tanto en el *pellet* bacteriano como en el sobrenadante.

Cuadro 10. Detección de genes asociados a bacteriófagos en *pellet* bacteriano y sobrenadantes obtenidos tras las inducciones con líquido ruminal nutritivo (LRN), caldo LB y mitomicina C. Se realizó la detección por PCR punto final de los genes *stx2* 325pb, *tail* 189pb, *terminase* 344pb, *capsid* 300pb y *holin* 178pb, los cuales se asocian a bacteriófagos. La detección se realizó tanto en el *pellet* bacteriano como en los sobrenadantes, de los ensayos de inducción (n=3). Se evaluaron las distintas concentraciones de LRN (100%, 50% y 25%), así como los controles de crecimiento en caldo LB y la inducción con mitomicina C. *p** (*pellet* bacteriano), *s** (sobrenadante), *D** (detectado) y *ND** (no detectado)

genes	<i>stx-2</i>		<i>tail</i>		<i>terminase</i>		<i>capsid</i>		<i>holin</i>	
Tratamientos / origen	<i>p*</i>	<i>s*</i>	<i>p*</i>	<i>s*</i>	<i>p*</i>	<i>s*</i>	<i>p*</i>	<i>s*</i>	<i>p*</i>	<i>s*</i>
LB control positivo	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
MitomicinaC control positivo	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
LRN100	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

LRN75	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
LRN50	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Cuantificación de genes asociados a bacteriófagos (*stx2* y *tail*) por PCR en tiempo real (qPCR)

Debido a la presencia de genes asociados a bacteriófagos en el *pellet* bacteriano y en el sobrenadante de la cepa *Escherichia coli* PGV 26B-Coy 6, se evaluaron el número de copias genómicas en el *pellet* bacteriano entre los tratamientos LRN100, LRN75 y LRN50, así como las variaciones en el número de copias de dichos genes en el sobrenadante bajo las mismas condiciones. Esto con la finalidad de determinar el número de copias genómicas de profagos en el *pellet* bacteriano y de bacteriófagos en el sobrenadante, y establecer un posible incremento en la replicación de genes asociados con bacteriófagos, como resultado de la inducción.

En el *pellet* bacteriano, la cuantificación relativa se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Starocik, 2004), con el objetivo de determinar el incremento relativo en el número de copias genómicas de los genes *tail* y *stx1*, utilizando como referencia el gen de copia única *dxs* (Plotka et al., 2017).

Los resultados mostraron que la inducción con los distintos tratamientos generó un incremento relativo en el número de copias de *tail* y *stx1* en comparación con el control (Tabla 11). Para el gen *tail*, los mayores incrementos se observaron en los tratamientos LRN50 y LRN75, con valores de 1330 y 1750 copias relativas, respectivamente, seguidos del control con mitomicina, que presentó un incremento de 850 copias. En contraste, el tratamiento LRN100 mostró el menor número relativo de copias para este gen (Tabla 11).

Tabla 11. Cuantificación relativa de los genes *tail* y *stx1* en el *pellet* bacteriano de *E. coli* 26B-Coy 6 mediante RT-qPCR. Los valores se expresan como ΔCt ($\bar{X}$, $n=3$), $\Delta\Delta Ct$ e incremento relativo de copias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando *dxs* como gen de referencia. Se evaluaron los tratamientos control, mitomicina C y líquido ruminal (LRN50, LRN75 y LRN100), con tres réplicas biológicas por condición.

Tratamiento	ΔCt ($\bar{X}$), $n=3$	$\Delta\Delta Ct$	Incremento relativo de copias ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control (<i>tail</i>)	20.43	0	1
Mitomicina (<i>tail</i>)	10.7	-9.73	850
LRN50 (<i>tail</i>)	10.05	-10.38	1330
LRN75 (<i>tail</i>)	9.65	-10.78	1750
LRN100 (<i>tail</i>)	12.39	-8.04	260
Control (<i>stx1</i>)	34.29	0	1
Mitomicina (<i>stx1</i>)	26.71	-7.58	190
LRN50 (<i>stx1</i>)	28.63	-5.66	50
LRN75 (<i>stx1</i>)	25.98	-8.31	310
LRN100 (<i>stx1</i>)	21.56	-12.73	7000

En el caso del gen *stx1*, se observó el mayor incremento relativo en el tratamiento LRN100, con 7000 copias, seguido de LRN75 y LRN50, con incrementos de 310 y 50 copias relativas, respectivamente. Por su parte, el tratamiento con mitomicina presentó un incremento relativo de 190 copias (Tabla 11).

Una vez observados los cambios en el incremento relativo del número de copias genómicas, y con el fin de establecer una asociación con la inducción de bacteriófagos hacia el medio, se realizó una cuantificación absoluta de genes asociados con bacteriófagos, en este caso *tail* y *stx1*. Esto con la finalidad de determinar la liberación de bacteriófagos al medio inducida por el líquido ruminal.

En el caso del gen *tail*, se observó un incremento en el número de copias genómicas en el sobrenadante de las cepas inducidas con LRN100 con un número de copias genómicas de 3.5×10^8 , con respecto al número de copias presentes en el control sin inducir que fue de 3.38×10^6 . Para los tratamientos LRN 75% y LRN 50%, se observa un incremento en el número de copias con respecto del control, los cuales son 6.63×10^6 y 6.48×10^6 número de copias genómicas respectivamente. En el tratamiento con mitomicina C, se observa un número de copias de 3.94×10^6 menor al control (Figura 4).

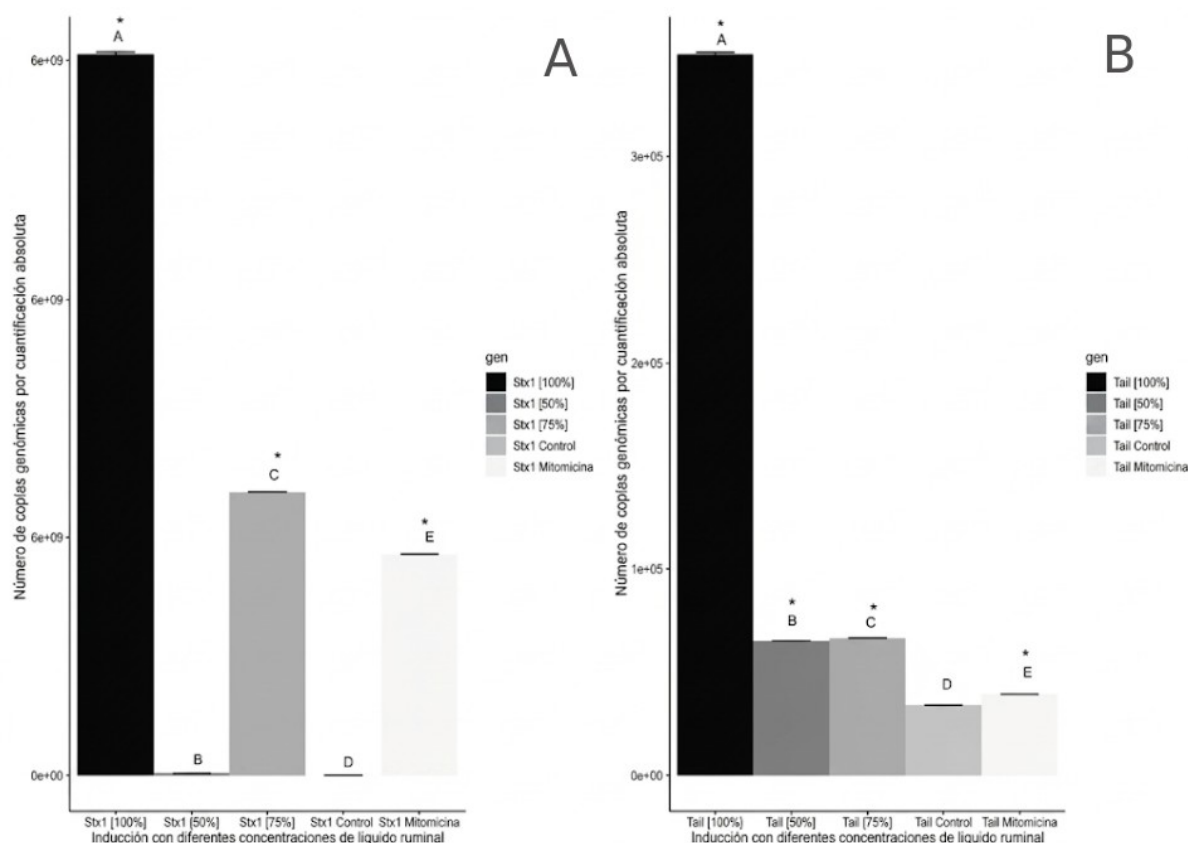


Figura 4. Número de copias genómicas totales de los genes *stx1* y *tail* en los sobrenadantes recuperados tras la inducción con líquido ruminal. (A) Copias genómicas de *stx1* en ADN viral recuperado de sobrenadantes bajo diferentes concentraciones de líquido ruminal (LRN 100%, 75% y 50%). (B) Copias genómicas de *tail* bajo las mismas condiciones experimentales. Se incluyen como controles sobrenadantes de cultivos en caldo LB y cepas inducidas con mitomicina C. Los valores representan la media $\pm$ DE; los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control no inducido ($p \leq 0.05$).

En el caso del gen *stx1* en el sobrenadante, se observó un incremento en el número de copias genómicas del gen *stx1* en el tratamiento con LRN100, con un número de copias

genómicas de 6.07×10^9 , en comparación con el sobrenadante del control sin inducir 3.63×10^7 . Mientras que para los tratamientos LRN50 y LRN75 se obtuvieron un número de copias genómicas de 3.75×10^7 y 2.38×10^9 respectivamente (Figura 4). En el caso de la mitomicina se obtuvo un total de 1.86×10^9 (Figura 4).

Estos resultados sugieren que el incremento relativo de copias del gen *tail* en el pellet bacteriano (Tabla 11), junto con el aumento de sus copias genómicas en los tratamientos LRN50 y LRN75 (Figura 4), están relacionados con la producción e inicio de la liberación de bacteriófagos al medio. Este fenómeno explicaría el comportamiento de la cinética de crecimiento (Figura 2), donde no se observa un declive total de la densidad celular; asimismo, el aumento en el número de copias de dichos genes podría asociarse al retraso o disminución en el crecimiento bacteriano observado.

Por el contrario, en el tratamiento LRN100, el menor incremento relativo de copias de genes fágicos en comparación con LRN50 y LRN75 (Tabla 11) respondería a una liberación de bacteriófagos derivada de una lisis bacteriana parcial (Figura 2). Esto explicaría la reducción en la replicación del gen *tail* en el pellet, pero con un incremento relativo de *stx1* en el mismo (Tabla 11). Dicho comportamiento se refleja en el aumento de copias genómicas de *stx1* y *tail* en el sobrenadante, lo que sugiere una liberación masiva de viriones sin alcanzar una lisis total de la población (Figura 2).

A diferencia de lo observado con agentes como la mitomicina C, donde se genera un incremento relativo de copias genómicas de *stx1* y *tail* en las células y un incremento en el número de copias genómicas en el sobrenadante (Tabla 11, Figura 4), Pero se observa un declive marcado en la cinética de crecimiento posiblemente por la liberación de bacteriófago y otros mecanismos.

Discusión

Se observó que cuatro de las nueve cepas, durante la cinética de crecimiento en LB, presentaron variaciones significativas ($p < 0.0001$) en la densidad bacteriana, estimada a partir de la OD_{600} , durante las primeras seis horas (Cuadro 3). Sin embargo, al finalizar la cinética de 12 horas, todas las cepas mostraron un comportamiento homogéneo (Cuadro 3, Figura 1a).

Estas variaciones podrían atribuirse a que las cepas fueron aisladas de distintos individuos y especies. Este hallazgo es consistente con lo reportado por Hilau y colaboradores (2022), quienes observaron variaciones sutiles en la tasa de crecimiento —medida mediante densidad bacteriana— en 11 cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospedadores, en cinéticas de hasta 60 horas, donde se modeló la dinámica entre crecimiento, muerte celular y densidad poblacional. En contraste, la cinética evaluada en el presente estudio fue de 12 horas, lo que permite observar principalmente la fase de crecimiento, pero no la fase de muerte celular.

Una limitante del presente estudio para determinar si este efecto está asociado al origen de las cepas es que, en algunos casos, solo se contó con una cepa por individuo, las cuales fueron seleccionadas con base en sus FV, procurando en ciertos casos que estos fueran distintos (Cuadro 1). Además, algunas cepas provenientes del mismo individuo mostraron variaciones en las etapas iniciales de la cinética. Por ejemplo, la cepa B2-31(2)36 presentó una cinética estadísticamente distinta ($p < 0.0001$) en comparación con B2-31(2)33, así como la cepa B26(2)3 en relación con B26(6)-31 y B26(6)-6.

Estos resultados indican que incluso cepas provenientes de un mismo individuo pueden presentar variaciones en su cinética de crecimiento, lo cual podría atribuirse a diferencias genéticas. De hecho, estas cepas presentan distintos FV y, en algunos casos, fenotipos

diferentes, como ocurre con B2-31(2)33 y B2-31(2)36, que presentan fenotipos 112ab:H2 y O8:H14, respectivamente.

Asimismo, esta variabilidad podría considerarse esperable en cepas no adaptadas a condiciones de laboratorio, a diferencia de cepas de referencia que han pasado por procesos de “domesticación”, derivados de sucesivas resiembras y selección de colonias. Este proceso puede generar poblaciones más homogéneas, lo que, aunque útil experimentalmente, puede representar una desventaja en estudios de evolución bacteriana debido a la pérdida de variabilidad genética (Eydallin et al., 2014).

En cuanto a las cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C, se observó un comportamiento significativamente diferente entre ellas en todos los tiempos evaluados ($p < 0.0001$) (Cuadro 3, Figura 1). Este comportamiento puede atribuirse al efecto de la mitomicina C como agente inductor de bacteriófagos. Se ha reportado que cepas de *E. coli* que portan factores de virulencia como las shigatoxinas presentan una disminución en la densidad bacteriana y un incremento en la liberación de bacteriófagos tras la exposición a este agente (Gamage et al., 2004; Bonanno et al., 2016).

Además, este efecto depende de diversos factores, como la célula hospedadora, el tipo de bacteriófago, el inductor y su concentración. En algunos casos, se han observado cambios desde los 30 minutos posteriores a la inducción con mitomicina C (Filipiak et al., 2020). En concordancia con estos reportes, las diferencias observadas en la cinética de crecimiento en este estudio podrían explicarse por la inducción de bacteriófagos en las nueve cepas de *E. coli* PGV.

No obstante, la persistencia de valores de absorbancia en las cepas tratadas indica que una fracción de la población bacteriana continuó replicándose o que el crecimiento se detuvo sin que ocurriera una lisis completa. Aunque las variaciones en la cinética de lisis pueden diferir entre cepas, como se observó en este estudio, una posible explicación es la presencia de mecanismos de defensa bacteriana, como sistemas toxina–antitoxina, CRISPR-Cas o muerte celular programada. Estos mecanismos han sido descritos como estrategias que limitan o modulan la lisis inducida por bacteriófagos (Bernheim y Sorek, 2020; Georjon y Bernheim, 2023).

A pesar de ello, en las nueve cepas de *E. coli* PGV se evidenció lisis bacteriana tras la inducción con mitomicina C, lo que sugiere la liberación de bacteriófagos, en concordancia con estudios previos que emplean este agente como inductor (Filipiak et al., 2020; Necel et al., 2022). Sin embargo, en este estudio no se evaluó directamente la presencia de partículas virales mediante microscopía electrónica en el sobrenadante, como se ha realizado en otros trabajos (Atkins et al., 2026; Yildirim et al., 2021).

Se realizó la detección de genes estructurales en los sobrenadantes, los cuales fueron previamente tratados con DNasa y RNasa con el objetivo de eliminar material genético libre no contenido dentro de cápsides virales. Esta metodología permite la eliminación del ADN bacteriano antes de la extracción del material genético de bacteriófagos (Sobolewski et al., 2020).

La detección de genes estructurales como *tail*, *terminase* y *capsid*, así como de los genes *stx2* y *holin* (Cuadro 5), ha sido previamente reportada en distintos estudios para la identificación diagnóstica de bacteriófagos del grupo Caudoviricetes (anteriormente denominado Caudovirales). Asimismo, se ha documentado la detección de bacteriófagos portadores de shigatoxinas en sobrenadantes, así como de bacteriófagos con capacidad lisogénica en diversas cepas bacterianas (Born et al., 2019; Ho et al., 2018; Withatanung et al., 2026; Zhang et al., 2020; Zhu et al., 2022).

Por lo tanto, la detección de estos genes, posterior al tratamiento con mitomicina C y al tratamiento enzimático de los sobrenadantes, sugiere que el material genético identificado proviene de bacteriófagos inducidos.

Adicionalmente, se evaluó la cepa 26B-Coy 6 mediante secuenciación masiva del material genético recuperado de los sobrenadantes tras la inducción con mitomicina C y el tratamiento con DNasa y RNasa. Las secuencias obtenidas fueron filtradas considerando únicamente aquellas con calidad Q30, cumpliendo con los criterios de calidad establecidos (Cuadro 6, Cuadro 7). De acuerdo con diversos estudios, para el ensamblaje *de novo* de genomas virales se pueden generar porcentajes de deduplicación entre 4% y 44%, el cual se debe considerar si se eliminan o no, debido a que pueden generar una disminución en la abundancia, y su presencia pueden aumentar complejidad en la biblioteca (Niu et al., 2010). Se considera también el contenido elevado de GC y la inclusión de múltiples genomas de bacteriófagos, con el fin de no subestimar su variabilidad y abundancia. Asimismo, se recomienda el uso de herramientas como metaSPAdes y SPAdes para el ensamblaje (Niu et al., 2010; Rihtman et al., 2016; Wang et al., 2020).

También se evaluó la contaminación por genomas de origen no viral, donde se recomienda que porcentajes superiores al 1% sean interpretados con cautela o que se repitan los análisis (Zolfo et al., 2019). En este estudio, el porcentaje de contaminación fue de 0.24%, lo que sugiere que la mayoría de los genomas identificados corresponden a bacteriófagos.

Una limitante en el análisis de genomas de bacteriófagos es la ausencia de secuencias de referencia estandarizadas, particularmente en ensamblajes *de novo*, lo que puede generar sobre-representación de secuencias o la formación de quimeras. Por ello, la evaluación de métricas de ensamblaje resulta fundamental (Turner et al., 2021).

Como resultado del análisis metagenómico, se identificó un conjunto de genes asociados a funciones estructurales, incluyendo proteínas de la cápside mayor, componentes de cola y tallo, así como la subunidad larga de la terminasa. Asimismo, se detectaron genes relacionados con procesos de lisis y lisogenia, como *holin*, además de genes que codifican para proteínas reguladoras como represores (*cI*) y antirrepresores (*cII*). También se identificaron genes asociados a sistemas toxina–antitoxina, los cuales forman parte de mecanismos de defensa bacteriana frente a infecciones virales (Cuadro 8).

Muchas de estas proteínas estructurales han sido descritas en bacteriófagos Caudoviricetes como características conservadas, a pesar de su alta divergencia genética (Veesler y Cambillau, 2011). Asimismo, la presencia de mecanismos de defensa en genomas de bacteriófagos ha sido previamente reportada, y se ha sugerido que estos pueden adquirirse mediante transferencia horizontal de genes (THG). En *E. coli* K-12, por ejemplo, se ha documentado que algunos sistemas antifágicos se encuentran codificados en profagos.

Adicionalmente, se identificaron genes involucrados en el control del ciclo lítico-lisogénico, tales como represores, antirrepresores y holinas, los cuales forman parte del cassette de lisis descrito para la liberación de bacteriófagos (Lee et al., 2015; Leuzzi et al., 2017).

La identificación de estos genes se realizó mediante el desarrollo de una base de datos personalizada denominada “proteinafagos”, implementada en ABRicate GPLv2, siguiendo las recomendaciones de los desarrolladores de la herramienta (Seemann, 2023). ABRicate es ampliamente utilizado para la detección de genes de virulencia, resistencia y plásmidos mediante alineamiento de secuencias contra bases de datos especializadas.

Aunque comúnmente se emplea con bases de datos como NCBI AMRFinderPlus, CARD, ResFinder, ARG-ANNOT, VFDB, PlasmidFinder y EcoH (Wang et al., 2025; Kunarisasi et al., 2025), en este estudio se optó por una base de datos personalizada, similar a lo

reportado por Cruz y colaboradores (2024), quienes lograron una tasa de identificación del 100% al adaptar la base de datos a su objetivo específico.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir de la anotación génica indican la presencia de bacteriófagos en el sobrenadante de la cepa *E. coli* 26B-Coy 6 inducida con mitomicina C. Estos hallazgos son consistentes con los criterios de análisis, identificación y anotación de genomas de bacteriófagos descritos previamente (Turner et al., 2021).

No obstante, una limitante del presente estudio es la construcción de la base de datos, la cual se basó en 100 genomas completos anotados. Dado que no todos los genes presentan funciones bien caracterizadas, sería posible mejorar la sensibilidad y cobertura mediante la ampliación de esta base de datos, incorporando un mayor número de genomas y anotaciones funcionales.

Con el objetivo de identificar las especies de bacteriófagos asociadas a la cepa *E. coli* 26B-Coy 6, se analizó la diversidad de bacteriófagos presentes en el sobrenadante, detectándose un total de siete especies. Este resultado sugiere la posible presencia de más de un bacteriófago en el genoma de esta cepa, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura.

La coexistencia de múltiples bacteriófagos en un mismo hospedador bacteriano ha sido previamente documentada. Por ejemplo, en *Vibrio cyclitrophicus* 1F-97, durante un estudio sobre la modulación de la inducción de bacteriófagos independiente del sistema SOS, se observó que la exposición a ciprofloxacina activó dos bacteriófagos distintos (fago $\phi 63$ y fago $\phi 72$). Sin embargo, cuando la inducción ocurre mediante proteínas autoinductoras, la lisis bacteriana y la liberación de partículas virales pueden ser específicas para cada fago, lo que indica una regulación diferencial dentro del mismo hospedador (Silpe et al., 2023a).

En este contexto, la presencia de múltiples bacteriófagos en un genoma bacteriano puede explicarse mediante procesos de polilisogenia; no obstante, estos resultados también sugieren que la inducción no es necesariamente un proceso uniforme, sino que puede estar finamente regulado a nivel de cada profago, lo que añade complejidad a la dinámica de liberación de bacteriófagos en sistemas naturales.

En concordancia con estos hallazgos, nuestros resultados sugieren que la mitomicina C induce procesos de lisis en cepas de *E. coli* PGV aisladas de carnívoros y bisontes, posiblemente mediados por bacteriófagos en respuesta a la activación del sistema SOS. De manera similar, en la cepa epidémica de Liverpool de *Pseudomonas aeruginosa* se ha documentado la presencia de múltiples bacteriófagos (LES ϕ 2, LES ϕ 3, LES ϕ 4, LES ϕ 5 y LES ϕ 6), algunos de los cuales se encuentran integrados en los mismos sitios genómicos en distintas cepas (James et al., 2012). Asimismo, en cepas de *Latilactobacillus sakei* se ha observado la presencia de más de un bacteriófago inducible, cuya activación depende del tipo de inductor y de la dosis empleada (Ambros et al., 2022).

En este contexto, la detección de siete especies de bacteriófagos en nuestro estudio es consistente con la posible liberación de múltiples fagos tras la inducción con mitomicina C. Entre las especies identificadas, destaca *Shigella virus* VASD como la más abundante en términos de lecturas mapeadas, seguido de *Shigella virus* POCJ13 y *Shigella virus* 7502Stx, los cuales están asociados a bacteriófagos portadores de shigatoxinas. El bacteriófago *Shigella virus* VASD fue originalmente aislado de *Shigella sonnei* en un hospital en Baja California en 2014, a partir de pacientes con cuadros entéricos, y presenta relaciones filogenéticas cercanas con los otros fagos detectados (Carter et al., 2016).

Una limitante del presente estudio es que no se realizó la secuenciación del genoma bacteriano completo, lo que impide determinar el número total de profagos presentes y su

potencial de inducción, así como confirmar la existencia de polilisogenia. No obstante, al comparar el contig más largo ensamblado con genomas de referencia en GenBank (Cuadro 10), se observó una similitud superior al 95% con *Shigella phage* 7502Stx, *Stx2-converting phage* 1717, *Shigella phage* POCJ13 y *Shigella phage* Ss-VASD.

Este alto grado de similitud sugiere que el mapeo mediante FastViromeExplorer podría generar cierta redundancia debido al uso de lecturas cortas. Sin embargo, la detección adicional de lecturas correspondientes a *Shigella phage* SfIV y *Enterobacteria phage* HK630, las cuales no se alinearon con el contig principal, podría indicar la presencia de múltiples bacteriófagos en el genoma de la cepa. Por ello, futuros estudios deberían incluir la secuenciación completa del genoma bacteriano para identificar regiones de profagos y confirmar la diversidad de bacteriófagos observada.

Por otra parte, la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6, aislada de coyote y portadora de shigatoxinas, mostró una disminución en la densidad bacteriana tras el tratamiento con mitomicina C, junto con la presencia de genes estructurales de bacteriófagos y secuencias asociadas a fagos portadores de shigatoxinas en el sobrenadante. Además, presenta características típicas de cepas STEC y pertenece al serogrupo O153, el cual ha sido reportado tanto en ganado como en humanos, y asociado a procesos diarreogénicos y a la presencia de los genes *stx1* y *stx2* (Hong et al., 2009; Kobayashi et al., 2009; Konishi et al., 2018).

En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la inducción con mitomicina C promueve la liberación de bacteriófagos, constituyendo un modelo adecuado para el estudio de la inducción fágica. Si bien la mitomicina C es ampliamente utilizada como inductor de bacteriófagos portadores de shigatoxinas, se ha demostrado que otros factores también pueden inducir estos procesos, como cambios en la presión hidrostática (Aertsen et al., 2005), el uso de agentes quelantes como EDTA (Imamovic y Muniesa, 2012) y el estrés oxidativo (Filipiak et al., 2020). En la mayoría de los casos, estos mecanismos están asociados a la activación de la respuesta al daño del ADN mediada por el sistema RecA (Aertsen et al., 2005; Filipiak et al., 2020; Imamovic y Muniesa, 2012).

Se evaluó la capacidad del líquido ruminal para inducir la liberación de bacteriófagos mediante su aplicación en diferentes concentraciones (Figura 2). Este tratamiento generó una modificación en la cinética de crecimiento bacteriano en comparación con el control sin inducción (LB) y el control positivo de inducción (LB + mitomicina C).

Con el fin de descartar que la disminución en la densidad bacteriana se debiera a una limitación nutricional, el líquido ruminal fue previamente purificado y suplementado con diferentes concentraciones de medio LB, de manera que se mantuvieran concentraciones equivalentes de NaCl, extracto de levadura y peptona respecto al control sin inducción (Figura 2).

Bajo estas condiciones, la reducción en la densidad bacteriana observada en la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6 podría estar asociada a componentes presentes en el líquido ruminal con capacidad de inducir la liberación de bacteriófagos, los cuales, a su vez, contribuirían a la disminución de la población bacteriana. No obstante, los componentes específicos responsables de este efecto no fueron identificados, ya que no se realizó un análisis detallado de metabolitos en el líquido ruminal empleado.

Se ha reportado que el líquido ruminal de bovinos alimentados con forraje contiene metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, etanol, aminoácidos y glucosa, cuya concentración puede variar dependiendo de la dieta, según análisis por cromatografía de gases (Zhao et al., 2014). Por lo tanto, la disminución de la densidad bacteriana observada

no parece estar asociada a una limitación de nutrientes, sino que podría correlacionarse con la inducción de lisis mediada por bacteriófagos en presencia de líquido ruminal.

De hecho, se observó una correlación positiva entre la disminución de la densidad bacteriana y el incremento en la concentración de líquido ruminal ($R^2 = 0.802$, $p < 0.001$) (Figura 3), lo que respalda la hipótesis de un efecto dependiente de la concentración.

La inducción de bacteriófagos mediante diversos factores químicos y ambientales ha sido ampliamente documentada (Aertsen et al., 2025; Boling et al., 2020; Oh et al., 2019). En particular, se ha demostrado que ciertos componentes de la dieta, como carbohidratos (por ejemplo, fructosa) y ácidos grasos de cadena corta, pueden inducir procesos de lisis bacteriana mediada por bacteriófagos en modelos murinos (Oh et al., 2019). Asimismo, algunos productos comerciales, como picantes y edulcorantes, han mostrado capacidad para activar el ciclo lítico de bacteriófagos (Boling et al., 2020).

En este contexto, no resulta inesperado que el líquido ruminal —un ambiente complejo y dinámico— contenga compuestos con potencial inductor, como los ácidos grasos de cadena corta (Chatterjee y Duerkop, 2019). Además, se ha destacado el papel de los componentes de la dieta en la dinámica de los virus presentes en el rumen y su influencia sobre las comunidades bacterianas, lo que impacta en la estabilidad del ecosistema ruminal y en la salud del hospedador (Anderson et al., 2017).

Adicionalmente, el líquido ruminal puede albergar una diversidad de bacteriófagos. Por ejemplo, Gilbert y colaboradores (2017) lograron secuenciar cinco genomas completos de bacteriófagos presentes en este ambiente, identificando genes asociados a procesos de lisis bacteriana, lo que confirma su capacidad infectiva y su papel en la dinámica microbiana.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que el líquido ruminal podría contener una combinación de metabolitos derivados del metabolismo microbiano, componentes de la dieta y bacteriófagos residentes, los cuales, de manera individual o sinérgica, podrían inducir la activación de profagos, promoviendo la liberación de bacteriófagos y la consecuente lisis bacteriana.

Si bien la mitomicina C es ampliamente utilizada como inductor de bacteriófagos portadores de shigatoxinas, también se ha demostrado que otros factores pueden desencadenar estos procesos, como cambios en la presión hidrostática (Aertsen et al., 2005), el uso de agentes quelantes como el EDTA (Imamovic y Muniesa, 2012) y el estrés oxidativo (Filipiak et al., 2020). En la mayoría de los casos, estos mecanismos están asociados con la activación de la respuesta al daño del ADN mediada por el sistema RecA.

En este sentido, los resultados obtenidos con mitomicina C sugieren una inducción de bacteriófagos dependientes del sistema SOS-RecA en las cepas de *E. coli* PGV. Sin embargo, el efecto observado con el líquido ruminal, considerando su impacto estadísticamente significativo sobre el crecimiento bacteriano ($p < 0.0001$), podría implicar mecanismos de inducción alternativos o adicionales a los asociados con la respuesta SOS, como los descritos por Silpe y colaboradores (2023a).

Para confirmar la hipótesis de que el líquido ruminal indujo la liberación de bacteriófagos, en primer lugar, se detectaron mediante PCR de punto final genes que codifican proteínas estructurales de bacteriófagos (*tail*, *capsid* y *terminase*), un gen asociado a los procesos de lisis-lisogenia (*holin*) y un factor de virulencia relacionado con bacteriófagos presentes en la cepa (*stx2*) (Cuadro 10). Estos genes fueron detectados tanto en el sobrenadante —previamente tratado con RNasas y DNasas— como en el pellet bacteriano. Con la finalidad de proponer que en el sobrenadante de las cepas inducidas existía la presencia de

partículas virales –en este caso bacteriófagos– que podrían empaquetar material genético, por lo cual estaría protegido de los tratamientos con DNAsas. Este resultado no es limitante, ya que los genomas de los bacteriófagos contienen dichas secuencias.

Con el fin de confirmar la inducción de la liberación de bacteriófagos, se evaluaron mediante qPCR dos genes: *tail*, como marcador estructural, y *stx1*, como factor de virulencia. Se analizó si existía un incremento en el número de copias genómicas tanto en el pellet bacteriano como en el sobrenadante. Este enfoque permite inferir, por un lado, la replicación intracelular de genes de bacteriófagos y, por otro, el aumento de partículas virales liberadas al medio como resultado de la lisis bacteriana.

En el pellet bacteriano se observó un incremento relativo en el número de copias genómicas de los genes asociados a bacteriófagos (*stx1* y *tail*) en comparación con el control sin inducir, con incrementos de 1330, 1750 y 260 para los tratamientos LRN50, LRN75 y LRN100, respectivamente (Cuadro 11). Asimismo, estos valores fueron superiores al control de inducción con mitomicina C, excepto en el tratamiento LRN100, donde el incremento fue menor.

En el sobrenadante, se observó una mayor cantidad de copias genómicas de *stx1* en los tratamientos LRN100 y LRN75 en comparación con el control (Figura 4). Para el gen *tail*, la mayor cantidad de copias se detectó en el tratamiento LRN100, mientras que LRN50 y LRN75 presentaron valores menores, aunque similares entre sí, y superiores al control. En conjunto, estos resultados sugieren que el líquido ruminal podría inducir la producción de bacteriófagos de manera diferencial en la cepa *E. coli* PGV 26-B Coy 6.

El uso del gen de referencia *dxs* ha sido previamente reportado por Plotka y colaboradores (2017), quienes validaron su aplicación para la cuantificación del número de copias génicas mediante qPCR y PCR digital por gotas (ddPCR), particularmente en la estimación del número de copias del plásmido pBR322 en *E. coli* DH5α. Además, la evaluación de la inducción de bacteriófagos mediante la cuantificación de *stx1* ha sido reportada previamente, como en el estudio de Zhan y colaboradores (2020), donde se analizaron genes *stx1* y *stx2* en cepas STEC tras la inducción con diversos agentes (luz UV, EDTA, ciprofloxacina y mitomicina C), combinando qPCR, secuenciación y microscopía electrónica. Para genes estructurales, diversos estudios han propuesto el uso de genes de cápside; sin embargo, en este trabajo se propone el gen *tail* como marcador alternativo.

En cuanto a los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de líquido ruminal, es posible que se estén observando distintos fenómenos biológicos. A concentraciones bajas, se detecta un incremento en copias de genes estructurales como *tail*, lo que sugiere la producción de partículas virales. En contraste, a concentraciones altas, se observa un incremento más marcado en *stx1*, lo que podría indicar una mayor producción de factores de virulencia asociados a bacteriófagos.

En el sobrenadante, los resultados sugieren que a concentraciones altas (LRN100) ocurre una mayor liberación de bacteriófagos, evidenciada por el incremento en copias genómicas de ambos genes. En concentraciones más bajas, podría estar ocurriendo una liberación parcial o menos eficiente, lo que sugiere un proceso de lisis incompleta.

Este comportamiento podría estar relacionado con fenómenos descritos previamente, como el reportado por Liu y colaboradores (2022), quienes observaron en *Lactococcus lactis* la liberación de bacteriófagos sin necesidad de lisis completa de la célula hospedera. En ese estudio, se describió la producción de bacteriófagos asociados a membranas lipídicas, lo que permite la viabilidad bacteriana a pesar de la producción viral. Este mecanismo podría explicar la persistencia de señales en el pellet bacteriano.

Adicionalmente, nuestros resultados podrían estar relacionados con los mecanismos descritos por Silpe y colaboradores (2023a), en los que diferentes inductores activan distintos profagos dentro de una misma bacteria. En este estudio, se detectaron secuencias de bacteriófagos pertenecientes a las familias Siphoviridae y al orden Caudovirales en el genoma de la cepa *E. coli* 26B-Coy 6 inducida con mitomicina (Cuadro 8). Por lo tanto, es posible que el líquido ruminal contenga múltiples compuestos capaces de inducir diferencialmente diversos profagos, generando dinámicas dependientes de la concentración.

Finalmente, es importante señalar que este estudio presenta algunas limitaciones, como la falta de análisis del genoma bacteriano posterior a la inducción, la ausencia de caracterización morfológica de los bacteriófagos inducidos, y la falta de identificación de los compuestos presentes en el líquido ruminal. Asimismo, sería relevante realizar una segunda secuenciación posterior a la inducción. Por ello, se propone continuar con estudios que integren enfoques genómicos, metabolómicos y estructurales para comprender con mayor profundidad el efecto del líquido ruminal sobre la inducción de bacteriófagos en esta cepa.

Sin embargo, los hallazgos de este estudio sugieren que el líquido ruminal puede participar activamente en la inducción de bacteriófagos en cepas de *E. coli* PGV portadoras de *stx1* y *stx2*, lo que indica su potencial para movilizar factores de virulencia. La inducción de estos bacteriófagos podría favorecer procesos de THG en el ambiente ruminal, contribuyendo a la generación de nuevas variantes genéticas de enterobacterias con potencial patógeno, como las cepas productoras de shigatoxinas (STEC). Esto resalta el posible papel del ecosistema ruminal en la evolución y diversificación de bacterias de importancia en salud pública.

Este fenómeno podría contribuir a explicar la presencia de bovinos superexcretadores de Shigatoxinas. En este sentido, estudios recientes han analizado genómicamente cepas de *E. coli* aisladas de bovinos con alta y baja excreción de Shigatoxinas, encontrando que ambas comparten perfiles de virulencia y presentan niveles de similitud genética entre 92% y 100%, además de coexistir múltiples linajes genéticos de STEC O157 dentro de un mismo corral (Bumunang et al., 2024).

Estos hallazgos sugieren que la variabilidad fenotípica en la excreción podría no depender únicamente del genotipo bacteriano, sino también de factores ambientales, como la inducción de bacteriófagos.

En este contexto, proponemos que uno de los mecanismos que contribuyen a la generación y diversificación de cepas STEC de importancia en salud pública es la inducción de bacteriófagos portadores de Shigatoxinas dentro del microambiente ruminal, posiblemente mediada por compuestos presentes en el líquido ruminal. Esto resalta la necesidad de profundizar en el estudio de este fenómeno.

Adicionalmente, evidencia epidemiológica respalda la estrecha relación entre reservorios bovinos y casos humanos. Tarr y colaboradores (2025) analizaron 854 aislados de *E. coli* O157:H7 provenientes de bovinos y humanos en Alberta (2007–2019), encontrando que el 88.5% de los linajes humanos se originaron a partir de linajes bovinos. Por otra parte, Singh y colaboradores (2015) demostraron la transmisión interespecífica de cepas STEC, EHEC y EPEC entre bovinos lecheros y venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en un mismo agroecosistema en Michigan, EE. UU., identificando cepas genéticamente indistinguibles mediante huella digital (*fingerprinting*) por PCR y tipificación multilocus (MLST).

Este fenómeno adquiere especial relevancia en ecosistemas donde coexisten rumiantes domésticos y fauna silvestre, favoreciendo interacciones microbianas complejas. Un ejemplo de ello es el noreste de México, particularmente en la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua, de donde fueron aisladas las cepas utilizadas en este estudio (López-

Islas et al., 2022; López-Islas et al., 2024a). En estos sistemas, la dinámica ecológica podría facilitar tanto la inducción de bacteriófagos como la diseminación de cepas con potencial patógeno entre distintas especies hospedadoras.

Conclusión

El líquido ruminal actuó como agente inductor de bacteriófagos en una cepas de *E. coli* PGV (26B-Coy 6), estos bacteriófagos inducidos con líquido ruminal, presentan en su genoma genes asociados a shigatoxinas como *stx1*. Estos resultado sugiere que el líquido ruminal, como componente ambiental del rumen, tiene la capacidad de inducir la activación de la replicación de genes asociados a bacteriófagos en el genoma bacteriano y su liberación al medio, en cepas de *E. coli* PGV, en este caso shigatoxinas. Este fenómeno podría favorecer eventos de transferencia horizontal de genes (THG) a nivel ruminal, contribuyendo a la emergencia de enterobacterias patógenas de importancia en salud pública como STEC.

Referencias bibliográficas

- Adikesavan, A. K., Katsonis, P., Marciano, D. C., Lua, R., Herman, C., y Lichtarge, O. (2011). Separation of Recombination and SOS Response in *Escherichia coli* RecA Suggests LexA Interaction Sites. *PLoS Genetics*, 7(9), e1002244. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002244>
- Aertsen, A., Faster, D., y Michiels, C. W. (2005). Induction of Shiga Toxin-Converting Prophage in *Escherichia coli* by High Hydrostatic Pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1155–1162. <https://doi.org/10.1128/aem.71.3.1155-1162.2005>
- Ambros, C. L., y Ehrmann, M. A. (2022). Distribution, inducibility, and characterisation of prophages in *Latilactobacillus sakei*. *BMC microbiology*, 22(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02675-y>
- Anderson, C. L., Sullivan, M. B., y Fernando, S. C. (2017). Dietary energy drives the dynamic response of bovine rumen viral communities. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0374-3>
- Atkins, H., Stegman, N., y Putonti, C. (2026). Diverse Temperate Coliphages of the Urinary Tract. *Viruses*, 18(2), 179. <https://doi.org/10.3390/v18020179>
- Baranzoni, G. M., Fratamico, P. M., Gangiredla, J., Patel, I., Bagi, L. K., Delannoy, S., Fach, P., Boccia, F., Anastasio, A., y Pepe, T. (2016). Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00574>
- Batalini, L., Castro, S., Souto, C., Neitzke-Abreu, H. and Lima-Junior, M. (2020) Evaluation of DNA Extraction Methods for Detection of Leishmania by Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Molecular Biology*, 10, 265-272. doi: 10.4236/ajmb.2020.104018.
- Berger, M., Aijaz, I., Berger, P., Dobrindt, U., y Koudelka, G. (2019). Transcriptional and Translational Inhibitors Block SOS Response and Shiga Toxin Expression in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55332-2>
- Bernheim, A., y Sorek, R. (2020). The pan-immune system of bacteria: antiviral defence as a community resource. *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), 113–119.

<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>

Beutin, L., Hammerl, J. A., Reetz, J., y Strauch, E. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from cattle as a source of the Stx2a bacteriophages present in enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 Strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(8), 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.001>

Bhattacharjee, R., Nandi, A., Sinha, A., Kumar, H., Mitra, D., Mojumdar, A., Patel, P., Jha, E., Mishra, S., Rout, P. K., Panda, P. K., Suar, M., y Verma, S. K. (2022). Phage-tail-like bacteriocins as a biomedical platform to counter anti-microbial resistant pathogens. *Biomedicine; Pharmacotherapy*, 155, 113720. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113720>

Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Boling, L., Cuevas, D. A., Grasis, J. A., Kang, H. S., Knowles, B., Levi, K., Maughan, H., McNair, K., Rojas, M. I., Sanchez, S. E., Smurthwaite, C., y Rohwer, F. (2020). Dietary prophage inducers and antimicrobials: Toward landscaping the human gut microbiome. *Gut Microbes*, 11(4), 721–734. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1701353>

Bonanno, L., Petit, M. A., Loukiadis, E., Michel, V., y Auvray, F. (2016). Heterogeneity in Induction Level, Infection Ability, and Morphology of Shiga Toxin-Encoding Phages (Stx Phages) from Dairy and Human Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26:H11 Isolates. *Applied and environmental microbiology*, 82(7), 2177–2186. <https://doi.org/10.1128/AEM.03463-15>

Born, Y., Knecht, L.E., Eigenmann, M. A major-capsid-protein-based multiplex PCR assay for rapid identification of selected virulent bacteriophage types. *Arch Virol* 164, 819–830 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04148-6>

Bushnell, B., Rood, J., y Singer, E. (2017). BBMerge - Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PloS one*, 12(10), e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>

Cahill, J. y Young, R. (2019). Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Advances in virus research*, 103, 33–70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>

Carter, C. C., Fierer, J., Chiu, W. W., Looney, D. J., Strain, M., y Mehta, S. R. (2016). A Novel *Shiga Toxin 1a-Converting Bacteriophage* of *Shigella sonnei* With Close Relationship to *Shiga Toxin 2-Converting Pages* of *Escherichia coli*. *Open forum infectious diseases*, 3(2), ofw079. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw079>

Carter, M. Q., Pham, A., Du, W.-X. y He, X. (2021). Differential induction of Shiga toxin in environmental *Escherichia coli* O145:H28 Strains carrying the same genotype as the outbreak strains. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109029. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109029>

Casjens, S. R., y Hendrix, R. W. (2015). Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology*, 479-480, 310–330. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.010>

Chatterjee, A., y Duerkop, B. A. (2019). Sugar and Fatty Acids Ack-celerate Prophage Induction. *Cell host & microbe*, 25(2), 175–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.012>

- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., y Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic acids research*, 44(D1), D694–D697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>
- Chevallereau, A., Pons, B. J., van Houte, S., y Westra, E. R. (2021). Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00602-y>
- Chui, L., Li, V., Fach, P., Delannoy, S., Malejczyk, K., Patterson-Fortin, L., Poon, A., King, R., Simmonds, K., Scott, A. N., y Lee, M.-C. (2015). Molecular Profiling of *Escherichia coli* O157:H7 And Non-O157 Strains Isolated from Humans and Cattle in Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 986–990. <https://doi.org/10.1128/jcm.03321-14>
- Clabby, T., Tesson, F., Gaborieau, B. y Bernheim, A. (2025). Why do bacteria accumulate antiphage defence systems?. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 380(1934), 20240082. <https://doi.org/10.1098/rstb.2024.0082>
- Cumby, N., Reimer, K., Mengin-Lecreulx, D., Davidson, A. R., y Maxwell, K. L. (2015). The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of *E. coli* phage HK97. *Molecular microbiology*, 96(3), 437–447. <https://doi.org/10.1111/mmi.12918>
- Cruz, H., Pinheiro, M. y Borges, V. (2024). ReporType: A Flexible Bioinformatics Tool for Targeted Loci Screening and Typing of Infectious Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3172. <https://doi.org/10.3390/ijms25063172>
- Dallman, T. J., Jalava, K., Verlander, N. Q., Gally, D., Jenkins, C., Godbole, G., y Gharbia, S. (2022). Identification of domestic reservoirs and common exposures in an emerging lineage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 In England: A genomic epidemiological analysis. *The Lancet Microbe*, 3(8), e606–e615. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(22\)00089-1](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(22)00089-1)
- Davidson, A. R., Cardarelli, L., Pell, L. G., Radford, D. R. y Maxwell, K. L. (2012). Long noncontractile tail machines of bacteriophages. *Advances in experimental medicine and biology*, 726, 115–142. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_6
- de Sena Brandine, G., y Smith, A. D. (2019). Falco: High-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8, 1874. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21142.1>
- Dion, M. B., Oechslin, F., y Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature reviews. Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dobrindt, U., Chowdary, M. G., Krumbholz, G., y Hacker, J. (2010). Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology*, 199(3), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0161-2>
- Döpfer, D., Sekse, C., Beutin, L., Solheim, H., van der Wal, F. J., de Boer, A., Slettemeås, J. S., Wasteson, Y., y Urdahl, A. M. (2010). Pathogenic potential and horizontal gene transfer in ovine gastrointestinal *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1552–1562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04575.x>
- Elder, J., y Nightingale, K. (2013). Tracking of pathogens via virulence factors: Shiga

toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and potential risks for human disease. In *Advances in Microbial Food Safety* (pp. 227–259). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857098740.3.227>

Erill, I., Campoy, S., y Barbé, J. (2007). Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6), 637–656. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x>

Etcheverría, A. I., y Padola, N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Virulence*, 4(5), 366–372. <https://doi.org/10.4161/viru.24642>

Eydallin, G., Ryall, B., Maharjan, R., y Ferenci, T. (2014). The nature of laboratory domestication changes in freshly isolated *Escherichia coli* strains. *Environmental microbiology*, 16(3), 813–828. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12208>

Fang, Y., Brückner, L. L., McMullen, L. M., y Gänzle, M. G. (2022). Transduction of stx2a mediated by phage (Φ11-3088) from *Escherichia coli* O104:H4 In vitro and in situ during sprouting of mung beans. *International Journal of Food Microbiology*, 383, 109952. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109952>

Feiss, M., y Rao, V. B. (2012). The bacteriophage DNA packaging machine. *Advances in experimental medicine and biology*, 726, 489–509. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_22

Filipiak, M., Łoś, J. M., y Łoś, M. (2020). Efficiency of induction of Shiga-toxin lambdoid prophages in *Escherichia coli* due to oxidative and antibiotic stress depends on the combination of prophage and the bacterial strain. *Journal of Applied Genetics*, 61(1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00525-8>

Frazão, N., Sousa, A., Lässig, M., y Gordo, I. (2019). Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(36), 17906–17915. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906958116>

Gao, B., Liang, L., Su, L., Wen, A., Zhou, C., y Feng, Y. (2023). Structural basis for regulation of SOS response in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(2), e2217493120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2217493120>

Game, S. D., Patton, A. K., Hanson, J. F. y Weiss, A. A. (2004). Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage. *Infection and immunity*, 72(12), 7131–7139. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7131-7139.2004>

Gandon, S. (2016). Why Be Temperate: Lessons from Bacteriophage λ. *Trends in Microbiology*, 24(5), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.008>

Galkin VE, Yu X, Bielnicki J, Ndjinka D, Bell CE, Egelman EH. Cleavage of bacteriophage lambda cl repressor involves the RecA C-terminal domain. *J Mol Biol*. 2009 Jan 23;385(3):779-87. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19013467; PMCID: PMC2648975. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.081>

Gilbert, R. A., Kelly, W. J., Altermann, E., Leahy, S. C., Minchin, C., Ouwerkerk, D., y Klieve, A. V. (2017). Toward understanding phage: host Interactions in the rumen; complete genome sequences of lytic phages infecting rumen bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02340>

Georjon, H., y Bernheim, A. (2023). The highly diverse antiphage defence systems of

bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 21(10), 686–700.
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00934-x>

Green, M. R., y Sambrook, J. (2018). A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093500>

Hajeri, S., Vidalakis, G., y Yokomi, R. K. (2022). Detection of Viroids Using RT-qPCR. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2316, 153–162.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1464-8_14

Henrot, C., y Petit, M. A. (2022). Signals triggering prophage induction in the gut microbiota. *Molecular microbiology*, 118(5), 494–502.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14983>

Hilau, S., Katz, S., Wasserman, T., Hershberg, R., y Savir, Y. (2022). Density-dependent effects are the main determinants of variation in growth dynamics between closely related bacterial strains. *PLoS computational biology*, 18(10), e1010565. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010565>

Hobbs, Z., y Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS microbiology letters*, 363(7), fnw047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>

Hochschild, A., y Lewis, M. (2009). The bacteriophage λ CI protein finds an asymmetric solution. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(1), 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.12.008>

Hong, S., Oh, K.-H., Cho, S.-H., Kim, J.-C., Park, M.-S., Lim, H.-S., y Lee, B.-K. (2009). Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunology; Medical Microbiology*, 56(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2009.00545.x>

Howard, A., Carroll-Portillo, A., Alcock, J., y Lin, H. C. (2024). Dietary Effects on the Gut Phageome. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8690.
<https://doi.org/10.3390/ijms25168690>

Hou, R., Li, M., Tang, T. *et al.* Construction of *Lactobacillus casei* ghosts by Holin-mediated inactivation and the potential as a safe and effective vehicle for the delivery of DNA vaccines. *BMC Microbiol* 18, 80 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1216-6>

Ingle, D. J., Valcanis, M., Kuzevski, A., Tauschek, M., Inouye, M., Stinear, T., Levine, M. M., Robins-Browne, R. M., y Holt, K. E. (2016). In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. *Microbial genomics*, 2(7), e000064. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000064>

Imamovic, L., y Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-Independent Induction of Shiga toxin2-Encoding Phages by EDTA Treatment. *PLoS ONE*, 7(2), e32393.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032393>

James, C. E., Fothergill, J. L., Kade, H., Hall, A. J., Cottell, J., Brockhurst, M. A., y Winstanley, C. (2012). Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 12, 216.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-216>

Jandhyala, D. M., Vanguri, V., Boll, E. J., Lai, Y., McCormick, B. A., y Leong, J. M. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: an emerging pathogen with enhanced virulence. *Infectious disease clinics of North America*, 27(3), 631–649. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.05.002>

Jay-Russell, M. T., Hake, A. F., Bengson, Y., Thiptara, A., y Nguyen, T. (2014). Prevalence and characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated from stray dog and coyote feces in a major leafy greens production region at the United States-Mexico border. *PloS one*, 9(11), e113433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113433>

Kasman LM, Porter LD. Bacteriophages. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>

Keller, K. L., Overbeck-Carrick, T. L., y Beck, D. J. (2001). Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutation Research/DNA Repair*, 486(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(01\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00077-5)

Khalid, M., Miller, C., Gebregziabher, N., Guckien, Z., Goswami, S., Perkins, A., y Andreoli, S. P. (2023). Factors affecting dialysis duration in children with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05839-0>

Kobayashi, H., Kanazaki, M., Ogawa, T., Iyoda, S., y Hara-Kudo, Y. (2009). Changing prevalence of o-serogroups and antimicrobial susceptibility among STEC strains isolated from healthy dairy cows over a decade in Japan between 1998 and 2007. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(3), 363–366. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.363>

Kolodziejek, A. M., Minnich, S. A., y Hovde, C. J. (2022). *Escherichia coli* O157:H7 Virulence factors and the ruminant reservoir. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 35(3), 205–214. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000834>

Konishi, N., Obata, H., Kai, A., Ohtsuka, K., Nishikawa, Y., Terajima, J., y Hara-Kudo, Y. (2018). Major Vehicles and O-Serogroups in Foodborne Enterotoxigenic *Escherichia coli* Outbreaks in Japan, and Effective Detection Methods of the Pathogen in Food Associated with An Outbreak. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 59(4), 161–166. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.59.161>

Koudelka, A. P., Hufnagel, L. A., y Koudelka, G. B. (2004). Purification and characterization of the repressor of the shiga toxin-encoding bacteriophage 933W: DNA binding, gene regulation, and autocleavage. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7659–7669. <https://doi.org/10.1128/jb.186.22.7659-7669.2004>

Kunarisasi, S., Yuliandari, P., Pramono, A. K., Furqoni, A. H., Aliyah, S. H., Nurjannah, I., Thaiyibah, N., Pratama, R., y Permata Sari, N. I. (2025). Genomic characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Jakarta, Indonesia. *Molecular biology reports*, 52(1), 960. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-11076-z>

Krüger, A., Burgán, J., Friedrich, A. W., Rossen, J. W. A., y Lucchesi, P. M. A. (2018). ArgO145, a Stx2a prophage of a bovine O145:H- STEC strain, is closely related to phages of virulent human strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 60,

126–132. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.024>

Lee, C., Kim, J., Shin, S. G. y Hwang, S. (2008). Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 123(3), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.014>

Lee, H. J., Kim, H. J. y Lee, S. J. (2022). Control of λ Lysogenic *Escherichia coli* Cells by Synthetic λ Phage Carrying clantisense. *ACS Synthetic Biology*, 11(11), 3829–3835. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00409>

Lee, J. S., Jang, H. B., Kim, K. S., Kim, T. H., Im, S. P., Kim, S. W., Lazarte, J. M. S., Kim, J. S., y Jung, T. S. (2015). Complete Genomic and Lysis-Cassette Characterization of the Novel Phage, KBNP1315, which Infects Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLOS ONE*, 10(11), e0142504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142504>

Leuzzi, A., Grossi, M., Di Martino, M. L., Pasqua, M., Micheli, G., Colonna, B., y Prosseda, G. (2017). Role of the SRRz/Rz1 lambdoid lysis cassette in the pathoadaptive evolution of *Shigella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(4–5), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.03.002>

Leimbach, A., Hacker, J., y Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303

Li, X., Gallardo, O., August, E., Dassa, B., Court, D. L., Stavans, J., y Arbel-Goren, R. (2024). Stability and gene strand bias of lambda prophages and chromosome organization in *Escherichia coli*. *mBio*, 15(7), e0207823. <https://doi.org/10.1128/mbio.02078-23>

Little, J. W. (2014). Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion. In *Phages* (pp. 37–54). ASM Press. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555816506.ch3>

Li, T., Li, J., Tang, Z., Liu, X., Yao, S., Zhu, J., Wang, W., Huo, L., Chen, S., Zhang, G., y Liu, Z. (2025). Genomic evolution of enteric pathogens: mechanisms of pathogenicity and diagnostic innovations. *Frontiers in microbiology*, 16, 1647437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1647437>

Liu, Y., Thaker, H., Wang, C., Xu, Z. y Dong, M. (2022). Diagnosis and Treatment for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Toxins*, 15(1), 10. <https://doi.org/10.3390/toxins15010010>

Luong, T., Salabarria, A.-C., Edwards, R. A. y Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols*, 15(9), 2867–2890. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0>

López-Islas, J. J., Méndez-Olvera, E. T., Martínez-Gómez, D., López-Pérez, A. M., Orozco, L., Suzan, G., y Eslava, C. (2022). Characterization of *Salmonella* spp. and *E. coli* Strains Isolated from Wild Carnivores in Janos Biosphere Reserve, Mexico. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(9), 1064. <https://doi.org/10.3390/ani12091064>

López-Islas, J. J., Martínez-Gómez, D., Ortiz-López, W. E., Reyes-Cruz, T., López-Pérez, A. M., Eslava, C., y Méndez-Olvera, E. T. (2024)a. *Escherichia coli* Strains Isolated from American Bison (*Bison bison*) Showed Uncommon Virulent Gene Patterns and Antimicrobial Multi-Resistance. *Microorganisms*, 12(7), 1367. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071367>

- Łoś, M., y Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. *Advances in virus research*, 82, 339–349. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4>
- Marongiu, L., Burkard, M., Venturelli, S., y Allgayer, H. (2021). Dietary Modulation of Bacteriophages as an Additional Player in Inflammation and Cancer. *Cancers*, 13(9), 2036. <https://doi.org/10.3390/cancers13092036>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Meyer, J. R., Dobias, D. T., Weitz, J. S., Barrick, J. E., Quick, R. T., y Lenski, R. E. (2012). Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6067), 428–432. <https://doi.org/10.1126/science.1214449>
- Mirzaei, M. K., y Maurice, C. F. (2017). Ménage à trois in the human gut: Interactions between host, bacteria and phages. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>
- Mo, C. Y., Culyba, M. J., Selwood, T., Kubiak, J. M., Hostetler, Z. M., Jurewicz, A. J., Keller, P. M., Pope, A. J., Quinn, A., Schneck, J., Widdowson, K. L., y Kohli, R. M. (2017). Inhibitors of lexa autoproteolysis and the bacterial SOS response discovered by an academic–industry partnership. *ACS Infectious Diseases*, 4(3), 349–359. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00122>
- Necel, A., Bloch, S., Topka-Bielecka, G., Janiszewska, A., Łukasiak, A., Nejman-Faleńczyk, B., y Węgrzyn, G. (2022). Synergistic Effects of Bacteriophage vB_Eco4-M7 and Selected Antibiotics on the Biofilm Formed by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 11(6), 712. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060712>
- Niu, B., Fu, L., Sun, S., y Li, W. (2010). Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. *BMC bioinformatics*, 11, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-187>
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., y Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
- Oh, J.-H., Alexander, L. M., Pan, M., Schueler, K. L., Keller, M. P., Attie, A. D., Walter, J., y van Pijkeren, J.-P. (2019). Dietary Fructose and Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Bacteriophage Production in the Gut Symbiont *Lactobacillus reuteri*. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 273–284.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.016>
- Otsuji, N., Sekiguchi, M., Iijima, T., y Takagi, Y. (1959). Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 184(4692), 1079–1080. <https://doi.org/10.1038/1841079b0>
- Penades, J. R., Bacarizo, J., Marina, A., Alqasmi, M., Fillol-Salom, A., Roszak, A. W., y Ciges-Tomas, J. R. (2019). Hijacking the Hijackers: *Escherichia coli* Pathogenicity Islands Redirect Helper Phage Packaging for Their Own Benefit. <https://doi.org/10.2210/pdb6hn7/pdb>
- Plotka, M., Wozniak, M., y Kaczorowski, T. (2017). Quantification of Plasmid Copy Number with Single Colour Droplet Digital PCR. *PloS one*, 12(1), e0169846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169846>

Python Software Foundation. (2024). Python Language Reference, version 3.12.4. Disponible en <https://www.python.org/>

Posit team (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.

Prijbelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., y Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1). Portico. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

Ray, R., y Singh, P. (2022). Prevalence and Implications of Shiga Toxin-Producing *E. coli* in Farm and Wild Ruminants. *Pathogens*, 11(11), 1332. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111332>

Reinstein, S., Fox, J. T., Shi, X., Alam, M. J., y Nagaraja, T. G. (2007). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in the American bison (*Bison bison*). *Journal of food protection*, 70(11), 2555–2560. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.11.2555>

Rodríguez-Rubio, L., Haarmann, N., Schwidder, M., Muniesa, M., y Schmidt, H. (2021). Bacteriophages of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Their Contribution to Pathogenicity. *Pathogens*, 10(4), 404. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040404>

Salmond, G. P. C., y 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>

Sausset, R., Petit, M. A., Gaboriau-Routhiau, V., y De Paepe, M. (2020). New insights into intestinal phages. *Mucosal Immunology*, 13(2), 205–215. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5>

Seemann T, Abricate, Github <https://github.com/tseemann/abricate>, NCBI AMRFinderPlus - <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>, CARD - <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>, Resfinder - <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>, ARG-ANNOT - <https://doi.org/10.1128/aac.01310-13> VFDB - <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>

Serment-Guerrero, J., Dominguez-Monroy, V., Davila-Becerril, J., Morales-Avila, E., y Fuentes-Lorenzo, J. L. (2020). Induction of the SOS response of *Escherichia coli* in repair-defective strains by several genotoxic agents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 854–855, 503196. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503196>

Serra-Moreno, R., Jofre, J., y Muniesa, M. (2008). The CI Repressors of Shiga Toxin-Converting Prophages Are Involved in Coinfection of *Escherichia coli* Strains, Which Causes a Down Regulation in the Production of Shiga Toxin 2. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4722–4735. <https://doi.org/10.1128/jb.00069-08>

Shanmughapriya, V., Richard, S., Nagarajan, T., y Munavar, M. H. (2017). Ascribing a Novel Role for tmRNA of *Escherichia coli* in Resistance to Mitomycin C. *Future Microbiology*, 12(15), 1381–1395. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0148>

Shao Q, Trinh JT, y Zeng L. High-resolution studies of lysis-lysogeny decision-making in bacteriophage lambda. *J Biol Chem*. 2019 Mar 8;294(10):3343-3349. doi: 10.1074/jbc.TM118.003209. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30242122; PMCID: PMC6416446. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003209>

- Shi, T., y Friedman, D. I. (2001). The operator-early promoter regions of Shiga-toxin bearing phage H-19B. *Molecular Microbiology*, 41(3), 585–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02507.x>
- Shkoporov, A. N., Turkington, C. J., y Hill, C. (2022). Mutualistic interplay between bacteriophages and bacteria in the human gut. *Nature Reviews Microbiology*, 20(12), 737–749. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00755-4>
- Sobolewski, I., Adamowicz, K., Struck, A., Zylicz-Stachula, A., y Skowron, P. M. (2022). A Method for Isolation Bacteriophage Particles-Free Genomic DNA, Exemplified by TP-84, Infecting Thermophilic *Geobacillus*. *Microorganisms*, 10(9), 1782. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091782>
- Singh, P., Sha, Q., Lacher, D. W., Del Valle, J., Mosci, R. E., Moore, J. A., Scribner, K. T. y Manning, S. D. (2015). Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00029>
- Silpe, J. E., Wong, J. W. H., Owen, S. V., Baym, M., y Balskus, E. P. (2022). The bacterial toxin colibactin triggers prophage induction. *Nature*, 603(7900), 315–320. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04444-3>
- Silpe, J. E., Duddy, O. P., Johnson, G. E., Beggs, G. A., Hussain, F. A., Forsberg, K. J., y Bassler, B. L. (2023)a. Small protein modules dictate prophage fates during polylysogeny. *Nature*, 620(7974), 625–633. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06376-y>
- Siranosian, B. A., Tamburini, F. B., Sherlock, G., y Bhatt, A. S. (2018). *Acquisition, transmission and strain diversity of human gut-colonizing crAss-like phages*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/460113>
- Shuwen, H., y Kefeng, D. (2022). Intestinal phages interact with bacteria and are involved in human diseases. *Gut microbes*, 14(1), 2113717. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2113717>
- Staroscik A: DNA Copy Number Calculator. URI Technology Networks. <https://www.technologynetworks.com/tn/tools/copynumbercalculator>; Accessed: 01.02.2024
- Tarr, G. A. M., Chui, L., Stanford, K., Bumunang, E. W., Zaheer, R., Li, V., Freedman, S. B., Laing, C. R., y McAllister, T. A. (2025). Persistent cross-species transmission systems dominate Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology in a high incidence region: A genomic epidemiology study. *eLife*, 13, RP97643. <https://doi.org/10.7554/eLife.97643>
- Tithi, S. S., Aylward, F. O., Jensen, R. V., y Zhang, L. (2018). FastViromeExplorer: A pipeline for virus and phage identification and abundance profiling in metagenomics data. *PeerJ*, 6, e4227. <https://doi.org/10.7717/peerj.4227>
- Tyler, J. S., Mills, M. J., y Friedman, D. I. (2004). The operator and early promoter region of the shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7670–7679. <https://doi.org/10.1128/jb.186.22.7670-7679.2004>
- Turner, D., Adriaenssens, E. M., Tolstoy, I., y Kropinski, A. M. (2021). Phage Annotation Guide: Guidelines for Assembly and High-Quality Annotation. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 2(4), 170–182. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0013>

- Vanesse, P., Georgery, H., Duprez, T., Gerard, L., Collienne, C., Verroken, A., Crombé, F., Morelle, J., y Hantson, P. (2023). Severe Neurological Involvement in an Adult with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*-Hemolytic Uremic Syndrome Treated with Eculizumab. *Case Reports in Nephrology and Dialysis*, 7–14. <https://doi.org/10.1159/000528893>
- VanLoock, M. S., Yu, X., Yang, S., Galkin, V. E., Huang, H., Rajan, S. S., Anderson, W. F., Stohl, E. A., Seifert, H. S., y Egelman, E. H. (2003). Complexes of RecA with LexA and RecX differentiate between active and inactive RecA nucleoprotein filaments. *Journal of molecular biology*, 333(2), 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.053>
- Veesler, D., y Cambillau, C. (2011). A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 75(3), 423–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-11>
- Wang, X., Li, Y., y Yu, J. (2025). Whole-genome sequencing of two multidrug-resistant carbapenemase-producing *Serratia marcescens* strains. *The new microbiologica*, 48(2), 190–196. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41123506/>
- Wang, Z., Gao, S., Zhang, Y., Shen, H., y Cao, X. (2025). Prophage landscape in *Enterococcus faecium*: diversity, resistance genes, virulence factors, and endolysin profiling. *BMC genomics*, 26(1), 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-12172-x>
- Wang, Z., Wang, Y., Fuhrman, J. A., Sun, F., y Zhu, S. (2020). Assessment of metagenomic assemblers based on hybrid reads of real and simulated metagenomic sequences. *Briefings in bioinformatics*, 21(3), 777–790. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz025>
- Weel-Sneve, R., Bjoras, M., y Kristiansen, K. I. (2008). Overexpression of the LexA-regulated tisAB RNA in *E. coli* inhibits SOS functions; implications for regulation of the SOS response. *Nucleic Acids Research*, 36(19), 6249–6259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn633>
- Withatanung, P., Vanaporn, M., Chantratita, N., Chareonsudjai, S., Muangsombut, V., Janesomboon, S., Asawalertsang, T., Clokie, M. R. J., Galyov, E. E., y Korbsrisate, S. (2026). Phage-based diagnostic assay for melioidosis using multiplex PCR targeting *Burkholderia* phage terminase genes. *iScience*, 29(3), 114831. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2026.114831>
- Yang, P., Zhang, H., Yin, L., Chen, J., Chen, Y., Yang, H., Liu, Q., y Zhang, W. (2025). Genetic diversity of Microviridae phages in the human respiratory tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 15, 1629120. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1629120>
- Yildirim, Z., Sakin, T., Akçelik, M., y Akçelik, N. (2021). Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Food science and technology international*, 27(1), 56–72. <https://doi.org/10.1177/1082013220929836>
- Young R. (2014). Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea), 52(3), 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>
- Zhang Y, Liao Y-T, Salvador A, Sun X and Wu VCH (2020) Prediction, Diversity, and Genomic Analysis of Temperate Phages Induced From Shiga Toxin-Producing

Escherichia coli Strains. *Front. Microbiol.* 10-3093.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03093>

Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, G., Zhao, Z., Wang, H., y Ju, F. (2023). Deduplication Improves Cost-Efficiency and Yields of De Novo Assembly and Binning of Shotgun Metagenomes in Microbiome Research. *Microbiology spectrum*, 11(2), e0428222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04282-22>

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

Zhou, K., Ferdous, M., de Boer, R. F., Kooistra-Smid, A. M. D., Grundmann, H., Friedrich, A. W., y Rossen, J. W. A. (2015). The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Is driven by short-term adaptation. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 468.e7-468.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.12.009>

Zolfo, M., Pinto, F., Asnicar, F., Manghi, P., Tett, A., Bushman, F. D., y Segata, N. (2019). Detecting contamination in viromes using ViromeQC. *Nature biotechnology*, 37(12), 1408–1412. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0334-5>

Figuras suplementarias capítulo 2

Cuadro 1 suplementario. Cinética de crecimiento de las nueve cepas de *E.coli* PGV crecidas en LB e inducidas con mitomicina C. Medias $\pm$ DE (error estándar entre paréntesis). ANOVA de una sola vía: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, número de réplicas $n=3$, prueba estadística post hoc de Tukey.**

LB	2 horas		4 horas		6 horas		8 horas		10 horas		12 horas	
	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE
26-B	***		***		**							
Coy 6	0.233	0.0270	0.643	0.1015	0.689	0.0886	0.736	0.1153	0.851	0.1201	1.442	0.0342
B16(1)	***											
32	0.154	0.0494	0.359	0.1358	0.668	0.0492	0.588	0.0504	0.816	0.0351	1.438	0.1757
B2-31(2)3												
3	0.071	0.0093	0.308	0.0329	0.554	0.0096	0.594	0.0110	0.752	0.0101	1.191	0.0912
B2-31(2)3			***									
6	0.141	0.0203	0.221	0.0110	0.635	0.0231	0.757	0.0317	0.758	0.0031	1.485	0.0295
B26(2)			***									
3	0.085	0.0248	0.247	0.0090	0.615	0.0168	0.683	0.0100	0.752	0.0135	1.277	0.1533
B26(6)												
31	0.073	0.0070	0.472	0.0373	0.668	0.0254	0.743	0.0391	0.777	0.0374	1.176	0.0760
B26(6)												
6	0.104	0.0202	0.338	0.0190	0.650	0.0813	0.709	0.1261	0.816	0.1544	1.466	0.0868
Coy 3-19												
	0.158	0.0138	0.342	0.0422	0.568	0.0267	0.693	0.0110	0.696	0.0314	1.421	0.0208
Meph 15-28												
	0.201	0.0450	0.426	0.4660	0.645	0.0127	0.685	0.0075	0.758	0.0135	1.463	0.0319
ANOV A	F = 22.05	*** $p < 0.0001$	F = 19.11	*** $p < 0.0001$	F = 3.74	** $p = 0.0196$	F = 2.53	$p = 0.0718$	F = 1.70	$p = 0.1932$	F = 2.70	$p = 0.0587$
Mitomi-cina	2 horas		4 horas		6 horas		8 horas		10 horas		12 horas	
	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE	$\bar{X}$	$\pm$ DE
26-B			***				***					
Coy6	0.218	0.0115	0.530	0.0220	0.406	0.0578	0.251	0.0375	0.153	0.0368	0.076	0.0040
B16(1)												
32	0.166	0.0511	0.364	0.0512	0.243	0.0536	0.392	0.0555	0.214	0.1058	0.201	0.1390
B2-31(2)3					***		***					
3	0.123	0.0052	0.265	0.0156	0.533	0.0293	0.565	0.0099	0.459	0.0275	0.149	0.0139
B2-31(2)3											***	
6	0.13	0.0291	0.318	0.0284	0.259	0.0303	0.369	0.0262	0.118	0.0100	0.558	0.0266
B26(2)					***				***			
3	0.236	0.0133	0.281	0.0437	0.600	0.0076	0.444	0.0352	0.587	0.0067	0.140	0.0219

B26(6) 31	*** 0.074	0.0361	0.318	0.0049	0.343	0.0135	0.342	0.0156	0.37	0.0431	0.102	0.0110
B26(6) 6	0.202	0.0006	0.335	0.0115	0.362	0.0171	0.363	0.0369	*** 0.100	0.0350	0.047	0.0137
Coy 3- 19	0.158	0.0055	*** 0.461	0.0272	0.468	0.0279	*** 0.622	0.0120	0.471	0.0227	*** 0.625	0.0120
Meph 15-28	0.16	0.0294	0.396	0.0168	0.235	0.0195	*** 0.164	0.0317	0.150	0.0230	*** 0.562	0.0399
ANOV A	F = 19.91	*** $p <$ 0.0001 ***	F = 38.08	*** $p <$ 0.0001 **	F = 55.06	*** $p <$ 0.0001 ***	F = 73.61	*** $p <$ 0.0001 ***	F = 138.5 5	*** $p <$ 0.0001 ***	F = 454.5 8	*** $p <$ 0.0001 ***

Capítulo tres

Análisis metagenómico de bacteriófagos inducidos con mitomicina C de cepas de *Escherichia coli*, recuperadas de fauna silvestre del noreste de México.

Introducción

Los bacteriófagos son virus ampliamente distribuidos y presentes en prácticamente todos los ecosistemas. Sus abundancias han sido estudiadas en diversos ambientes, como: (1) sedimentos marinos, donde se han registrado concentraciones de 10^3 a 10^9 bacteriófagos por cm^3 (Danovaro et al., 2008); (2) suelos superficiales, con abundancias de 10^7 a 10^9 partículas virales por gramo de suelo (Emerson, 2019); y (3) en aguas marinas, donde se estima una proporción de aproximadamente 3 a 10 partículas virales por cada bacteria, con concentraciones que pueden alcanzar hasta 10^6 – 10^7 partículas virales por mililitro (Paul et al., 2002). En conjunto, se estima que en el planeta existen aproximadamente 10^{31} bacteriófagos, lo que equivale a un promedio de diez bacteriófagos por cada bacteria presente en la Tierra (Dion et al., 2020).

La infección viral en células bacterianas puede seguir diversos mecanismos que permiten el mantenimiento y la expresión del genoma viral. Tras la infección, los genomas de los bacteriófagos pueden integrarse en el cromosoma bacteriano mediante recombinación específica en sitios definidos o a través de mecanismos de transposición, como ocurre en los bacteriófagos λ y Mu, respectivamente. Sin embargo, algunos bacteriófagos pueden mantenerse como elementos extracromosomales; por ejemplo, el bacteriófago P1 persiste en forma circular tipo plásmido, mientras que el bacteriófago N15 se mantiene como un elemento lineal. En estos casos, los genomas virales pueden replicarse de manera coordinada con el genoma bacteriano o de forma autónoma (Howard-Varona et al., 2017).

Dicho ciclo inicia con la adsorción del bacteriófago a la célula bacteriana, proceso que requiere el reconocimiento de receptores de superficie, como el lipopolisacárido (LPS), lo que permite la fijación del fago a la bacteria (Nobrega et al., 2018). Posteriormente ocurre la inyección del material genético, en la cual el ADN del bacteriófago es introducido en la célula bacteriana. En el caso de los bacteriófagos con cola, se describe mediante el inyector o complejo de inyección asociado a la estructura de la cola, que permite la transferencia del ADN hacia el citoplasma bacteriano (Cornelis y Sorg 2026). Una vez dentro, el ADN viral entra en la fase de replicación, utilizando el ADN polimerasa de la célula hospedera para la síntesis de nuevas copias del genoma del fago. A continuación, se lleva a cabo el ensamblaje de las cápsides que atrapan el material genético viral, dando lugar a la formación de nuevos viriones (Leprince y Mahillon, 2023; Rao 2025). Durante este proceso se expresa un conjunto de genes relacionados con la lisis bacteriana, como aquellos que codifican lisozimas o proteínas del sistema holina-endolisina. La holina, en particular, actúa como una toxina que altera la membrana bacteriana, facilitando la lisis celular y la liberación de los bacteriófagos al medio (Cahill y Young 2019). El proceso de lisis provoca el declive natural de las poblaciones bacterianas, permitiendo la supervivencia de aquellas bacterias que poseen sistemas de defensa o “sistemas inmunes bacterianos” que le confieren resistencia a la infección por bacteriófagos (Puxty y Millard, 2023). Esta interacción genera una dinámica de depredación que regula y modula las poblaciones bacterianas en los ecosistemas (Lopez et al., 2025).

Por otra parte, el proceso de la lisogenia inicia con la adsorción del bacteriófago a la superficie bacteriana y la posterior inyección de su material genético (Shao et al., 2019). En esta etapa, el ADN del fago se integra al genoma bacteriano en sitios de integración, dando

lugar a nuevas variantes genéticas (Van Duyne y Landy 2024). En el caso de integrarse en el genoma bacteriano, pueden generar eventos de transposición. En algunos casos, tras el evento de integración, el genoma viral queda como un bacteriófago críptico, por lo que ya no puede liberarse del genoma bacteriano. Sin embargo, algunos bacteriófagos permanecen como profagos capaces de liberarse del genoma bacteriano y generar un ciclo lítico, en el cual se induce la lisis bacteriana y se liberan nuevas partículas virales (Ku et al., 2025). En otros casos, pueden mantenerse infecciones virales crónicas en las células bacterianas, en las que no ocurre lisis bacteriana, pero sí la liberación continua de viriones al medio (Howard-Varona et al., 2017). El equilibrio entre los estados de lisis y lisogenia puede ser alterado por diversos factores, como la comunicación interbacteriana, condiciones ambientales, procesos metabólicos y situaciones de estrés o daño. En estas circunstancias, los bacteriófagos pueden permanecer en estado quiescente como profagos hasta que se desencadenan señales que inducen un nuevo ciclo lítico o lisogénico (Henrot et al., 2022).

La transferencia de material genético tras una infección por bacteriófagos tienen un impacto significativo en la evolución de las poblaciones bacterianas (Howard-Varona et al., 2017). Este proceso puede entenderse desde dos perspectivas principales. La primera corresponde a la presión de selección ejercida por los bacteriófagos a través de la depredación y la lisis bacteriana, fenómeno asociado al ciclo lítico (Rodríguez-Valera et al., 2009). La segunda forma en que los bacteriófagos direccionan la evolución bacteriana es a través de la transducción, uno de los tres mecanismos de la transferencia horizontal de genes (THG) (Penades et al., 2015).

La transducción puede presentarse en dos modalidades principales: 1) transducción generalizada, proceso en el cual un bacteriófago es capaz de transferir genes de una bacteria donadora a una bacteria receptora (Wolput et al., 2024). Esto ocurre durante el ciclo lítico, cuando, durante el ensamblaje de nuevas partículas virales, cuando el fago empaqueta fragmentos del genoma bacteriano y los transfiere a otra célula durante una infección subsecuente (Filloi-Salom et al., 2019); y 2) transducción especializada, en la cual únicamente los genes localizados en sitios específicos de integración del fago son empaquetados dentro de la cápside viral y transferidos a una bacteria receptora (Volkova et al., 2014).

Mediante este proceso, las bacterias adquieren nuevo material genético donado por los bacteriófagos, lo cual puede conferirles diversas ventajas adaptativas. Entre ellas se incluyen: 1) la adquisición de características asociadas a la virulencia, mediante la incorporación de factores de virulencia (FV) y genes de resistencia antimicrobiana (GRA), lo que puede convertir a cepas previamente no patógenas en patógenas (Khalil et al., 2016; Oladeinde et al., 2019; Uchiyama et al., 2014); 2) la obtención de nuevas capacidades metabólicas, asociadas al “*fitness*” metabólico, que permiten la colonización de nuevos nichos ecológicos (Puxty y Millard, 2023); y 3) la incorporación de genes relacionados con la respuesta inmune bacteriana en contra de la infección por bacteriófagos (Bernheim y Sorek, 2019). El material genético puede ser transmitido entre bacterias mediante THG y, posteriormente, heredarse de forma vertical, favoreciendo la permanencia de nuevas características en las poblaciones bacterianas y direccionando su evolución (Bernabeu et al., 2024).

Desde el enfoque de “Una Sola Salud” (*One Health*) han buscado vincular la presencia de genes de resistencia en muestras de origen humano, animal y ambiental, con el fin de comprender la dinámica de su diseminación. Aunque tradicionalmente esta diseminación se ha asociado principalmente a elementos genéticos móviles como los plásmidos, el papel de los bacteriófagos ha sido menos explorado (Awarh et al., 2025).

Un ejemplo de gran importancia donde se observa la transferencia de bacteriófagos es el brote de cólera registrado en Malawi, ocurrido entre marzo de 2022 y mayo de 2023 y causado por *Vibrio cholerae*, se identificó la presencia del bacteriófago CTXφ (*Vibrio* virus CTXphi), el cual codifica la toxina del cólera, particularmente asociado al genotipo ctxB7, característico de las cepas de la séptima pandemia. Mediante análisis filogenéticos de aislados obtenidos durante el brote (2022–2023) en comparación con brotes históricos a nivel global, se observó que este evento estuvo relacionado con la introducción de un linaje altamente virulento de origen asiático, seguido de su expansión clonal favorecida por condiciones ecológicas y sociales, incluyendo factores climáticos. En este contexto, la participación de bacteriófagos como CTXφ resalta su papel en la transferencia horizontal de genes de virulencia y en la evolución de cepas patógenas (Chaguza et al., 2024).

Por otra parte, este fenómeno es crucial en *Escherichia coli*. Un ejemplo emblemático es el brote ocurrido en Alemania en 2011, asociado a la aparición de un nuevo patotipo de *E. coli*, resultado de la adquisición de genes *stx*'s mediada por bacteriófagos mediante procesos de transducción (Navarro-García, 2015; Tokuda y Shintani, 2024). Así mismo, se ha documentado brotes de infecciones por STEC asociados al consumo de lechuga romana en Estados Unidos, donde eventos ocurridos en distintos años (2017, 2018 y 2019) y en diferentes regiones geográficas (Santa María y Salinas Valley, California) fueron atribuidos a una misma cepa genética recurrente de *E. coli* O157:H7. Mediante rastreo epidemiológico y análisis de secuenciación genómica, se evaluaron las características de las cepas involucradas con el objetivo de identificar posibles fuentes de contaminación. Los resultados mostraron que las cepas responsables de los brotes de 2018 y 2019 eran genéticamente indistinguibles de la cepa asociada a un brote en 2017 vinculado a vegetales de hoja verde, lo que sugiere la presencia de un reservorio ambiental persistente en las regiones productoras de California. En particular, durante el brote de 2018, la cepa fue aislada de un depósito de agua agrícola utilizado para riego, lo que sugiere un posible mecanismo de contaminación de los cultivos. En el caso del brote de 2019, la misma cepa fue recuperada de heces de ganado y del suelo circundante, lo que resalta la importancia de los reservorios animales en la persistencia y diseminación de cepas patógenas (Waltenburg et al., 2019). De manera más amplia, se han observado distintos brotes por cepas STEC desde 1994 hasta el 2025, donde participan cepas de *E. coli* híbridas de STEC, en algunos casos participando bacteriófagos que codifican para las toxinas *stx2d* o *stx2a* y *ehxA* (Jekins et al., 2025).

La presencia de estos elementos no se limita a escenarios de brotes humanos. Algunas cepas de *E. coli* aisladas de fauna silvestre presentan combinaciones de factores de virulencia (FV) distintas a los patotipos clásicos descritos. Algunos de estos FV podrían encontrarse en genomas de bacteriófagos y ser inducibles; de esta forma, dichos bacteriófagos podrían participar de manera natural en la transferencia horizontal de genes (THG), favoreciendo la emergencia de patotipos (López-Islas et al., 2022; López-Islas et al., 2024).

Un ejemplo de esta transferencia de genes (THG) mediada por bacteriófagos fue demostrado *in vitro* en un estudio en el que se analizaron 197 aislados de *E. coli* provenientes de distintas aves entre ellas: pollos, pavos y patos de traspatio, ubicadas en el estado de México. Estos aislados presentaron altos niveles de resistencia a antibióticos, incluyendo ampicilina (80.7%), tetraciclina (64.4%), carbenicilina (56.3%) y ácido nalidíxico y trimetoprima-sulfametoxazol (26.9% en ambos casos). A nivel genético, se identificaron genes de resistencia como *blaTEM* (β-lactámicos), *tetA* y *tetB* (tetraciclinas), *sulfI* (sulfonamidas) y *qnrA* (quinolonas). Adicionalmente, se aislaron bacteriófagos a partir de aves silvestres migratorias que habitan el humedal de Chimaliapan, en el Estado de México. Al poner en contacto estos bacteriófagos con los aislados de *E. coli* de aves de traspatio, se observó la transferencia de genes de resistencia a antibióticos mediante transducción, evidenciada por la adquisición de genes de resistencia en cepas que previamente no los

poseían. Estos resultados demuestran el papel de los bacteriófagos como vectores en la diseminación de resistencia antimicrobiana entre poblaciones bacterianas en ambientes compartidos (Talavera-González et al., 2021).

En concordancia con lo anterior, Aworh y colaboradores (2025) analizaron 97 genomas completos de *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), seleccionados de un total de 448 aislados recolectados entre mayo y diciembre de 2020 en dos mataderos ubicados en Abuja y Lagos, Nigeria. Las muestras incluyeron heces de trabajadores, contenido intestinal de bovinos sacrificados y muestras ambientales de los mataderos. Mediante el análisis genómico, se identificaron regiones de profagos y se evaluó la presencia de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos, factores de virulencia y genes de resistencia a metales pesados asociados a dichas regiones. Los resultados revelaron que las cepas de *E. coli*, independientemente de su origen (humano, animal o ambiental), contenían múltiples profagos en sus genomas, y que varios de estos portaban genes de resistencia. Esto sugiere que los bacteriófagos pueden actuar como vehículos potenciales en la diseminación de la resistencia antimicrobiana a través de la interfaz humano-animal-ambiente.

Además, a una escala molecular, estudios comparativos entre cepas de *E. coli* STEC y cepas no STEC de origen humano y bovino han demostrado que la presencia y diversidad de bacteriófagos portadores de *stx* varían según el origen de las cepas, así como sus sitios de inserción dentro del genoma bacteriano. Las cepas de origen bovino y de alimentos portan mayoritariamente el subtipo *stx1a*, mientras que las cepas de origen humano presentan tanto *stx1a* como *stx2a* (Bonanno et al., 2015).

Los principales sitios de integración de los bacteriófagos *Stx* corresponden a los genes *wrbA* y *yehV*, los cuales pueden albergar distintos bacteriófagos portadores de *stx*. En menor medida, también se han identificado sitios de inserción en los genes *yecE* y *sbcB*, particularmente en cepas de origen bovino. Adicionalmente, se ha descrito un bacteriófago que transporta el gen *espK*, el cual se encuentra integrado en el gen *ssrA* en la mayoría de las cepas STEC, pero está ausente o es poco frecuente en cepas *stx*-negativas. En contraste, en las cepas no STEC analizadas, los sitios de inserción bacterianos (*wrbA*, *yehV*, *yecE* y *sbcB*) se encontraron intactos, lo que sugiere la posible pérdida de bacteriófagos *stx* mediante procesos de escisión espontánea a lo largo de su evolución (Bonanno et al., 2015).

Dado lo anterior, sabemos que los bacteriófagos pueden comportarse como vehículos de material genético, tanto de FV como de GRA, favoreciendo la THG (Aworh et al., 2025; Tokuda y Shintani, 2024). Además, participan en la dinámica ecológica entre distintas bacterias, lo que provoca que, en algunas poblaciones bacterianas, disminuya el número de microorganismos, afectando principalmente a las bacterias susceptibles de ser infectadas. Al mismo tiempo, los bacteriófagos pueden conferir protección contra futuras infecciones por otros bacteriófagos (Lopez et al., 2025).

Sin embargo, aún no se conoce con claridad cómo ocurre la dinámica ecológica cuando múltiples bacteriófagos están presentes en un mismo genoma, ni cómo se desarrollan estos eventos de forma natural y cuál es su impacto sobre la THG de genes de virulencia y de resistencia antimicrobiana en sitios donde pueden coexistir bacterias de un mismo género que habitan distintos hospedadores. Este es el caso de cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV) pertenecientes a bisontes y carnívoros que comparten un área ecológica común, como la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua.

En este contexto, el objetivo de este estudio es describir la dinámica ecológica en la que participan los bacteriófagos presentes en cepas de *E. coli* PGV recuperadas de fauna silvestre, identificar las especies de bacteriófagos presentes y analizar, mediante un

enfoque ecológico, las posibles interacciones a nivel local que podrían estarse suscitando entre las cepas de *E. coli* PGV.

Lo anterior, con la finalidad de proponer una posible THG de genes de virulencia y de resistencia antimicrobiana, y así contribuir al entendimiento de los procesos evolutivos de las cepas de *E. coli* PGV presentes en una misma región.

Materiales y métodos

Selección de cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia (PGV) aisladas de fauna silvestre. Se dispuso de un acervo de 136 cepas de *E. coli* aisladas, genotipificadas y serotipificadas provenientes de fauna silvestre, entre las especies animales se encuentran: coyotes (*Canis latrans*), zorras del desierto (*Vulpes macrotis*), zorrillo rayado (*Mephitis mephitis*), zorrillo de capucha (*Mephitis macroura*) y bisontes (*Bison bison*) presentes en la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua, México. Las cepas se encuentran resguardadas en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-Xochimilco (López-Islas et al., 2022; López-Islas et al., 2024a).

Se seleccionaron nueve cepas de las 136, de las cuales se conocen sus factores de virulencia y sus serotipos. Las características de estas cepas son: Tres cepas aisladas de carnívoros: 1) 26-B Coy 6: *stx1-stx2*, O17:H18 (previamente secuenciada y con librería genética disponible); 2) Coy 3-19: *stx1-stx2*, O153:H28; 3) Meph 15-8: *escV-eae*, O139:H6. Seis cepas aisladas de bisontes: 1) B16(1)32: *stx2-eae-ial*, O22:H8; 2) B26(2)3: *escV-eae-ial*, O22:H11; 3) B26(6)6: *escV-eae-bfpB-ial*, O26:H—; 4) B26(6)31: *eae-ial*, O26:H11; 5) B2-31(2)33: *stx1-stx2*, O112ab:H2; 6) B2-31(2)36: *stx1-eae*, O8:H14 (Vease Cuadro 1 capítulo 2, Materiales y métodos).

Inducción de bacteriófagos con mitomicina C. Las nueve cepas seleccionadas de *E. coli* PGV (EPGV) fueron sembradas en caldo Luria-Bertani (LB) e incubadas durante la noche a 37 °C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730 UV/VIS) con el fin de estandarizar la suspensión bacteriana a una concentración equivalente a 0.5 de McFarland 1×10^8 UFC/mL.

Tras estandarizar la suspensión bacteriana, se inocularon 50 mL de caldo LB con 1 mL del inóculo, el cual se incubó a 37 °C. A las 2 horas de crecimiento, cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica (previamente estandarizado en una cinética de crecimiento bacteriano), se añadieron 15 µL de mitomicina C (Mitomycin C, Fisher BioReagents™) a una concentración de 30 µg/mL, para obtener una concentración final de 0.3 µg/mL.

Posteriormente, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 22 horas. Finalizado el periodo de incubación, cada cultivo fue transferido a tubos cónicos de 50 mL para su procesamiento posterior.

Purificación de fagos. Los cultivos bacterianos inducidos con mitomicina C fueron centrifugados a $3,260 \times g$ durante 20 minutos (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 8). El sobrenadante de cada muestra fue recuperado y transferido a tubos de membrana de diálisis (Spectra/Por®, Biotechne) con un punto de corte de 12 kDa.

Cada membrana de diálisis fue colocada en una solución saturada al 70% de glucosa, en condiciones estáticas y a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron filtradas secuencialmente a través de membranas de nitrocelulosa (MF-Millipore®) de 0.8 µm, 0.45 µm y 0.22 µm.

El filtrado se recuperó y se colocó en la ultracentrífuga (Beckman Coulter L-80 Optima Ultracentrifuge) a 3,260 x g durante 2 horas a 4 °C. El sobrenadante fue desechado para obtener el pellet vírico.

Al pellet viral se le añadieron 1 µL de DNasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich®) y 1 µL de RNasa (1 mg/ml, Sigma-Aldrich®) y se incubó a 56 °C durante 30 minutos, con la finalidad de eliminar el material genético no protegido por cápside. Posteriormente, se agregó 1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄) y la muestra se sometió nuevamente a ultracentrifugación a 200,700 x g durante 2 horas a 4 °C. Finalmente, se recuperó el pellet purificado de fagos.

Extracción de ADN de fagos. La extracción de ADN de bacteriófagos se realizó mediante un método modificado basado en sílica. Al pellet viral purificado se le añadieron 500 µL de solución de lisis total (Tiocianato de guanidina 5M, Tris-HCl 10mM pH6.4, EDTA pH 8, Triton 2.5%) y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 50 µL de sílica (Sigma-Aldrich®) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó a 12,353 x g durante 5 minutos y se recuperó la pastilla de sílica. A esta se le añadieron 500 µL de solución de lisis simple (Tiocianato de guanidina 5M, Tris-HCl 10mM pH6.4 y EDTA pH 8), se incubó durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 12,353 x g durante 5 minutos. Se recuperó nuevamente la pastilla de sílica y se realizó un lavado con etanol al 70%. Posteriormente, se centrifugó a 16,060 x g durante 15 segundos, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con acetona (método modificado de Batalini et al., 2020).

Después, se centrifugó nuevamente a 16,060 x g durante 15 segundos y se decantó el sobrenadante. La pastilla de sílica se dejó secar a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadió solución TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM) y se incubó a 56 °C durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se centrifugó a 16,060 x g durante 30 segundos y se recuperó el sobrenadante que contenía el ADN purificado, visualizado en un gel de agarosa al 2% y cuantificado por absorbancia UV a 260nm (Espectrofotómetro BECKMAN COULTER® DU 730 UV/VIS).

Secuenciación y análisis genético. El ADN recuperado de los bacteriófagos fue secuenciado en la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), utilizando la plataforma Illumina NextSeq 500 y con un rendimiento de 500 ciclos, de las cuales se generaron bibliotecas lecturas pareadas.

Una vez obtenidas las bibliotecas provenientes de las lecturas pareadas de la secuenciación de cada cepa, se evaluó la calidad de las lecturas con FastQC v0.12.0 (de Sena Brandine y Smith, 2019) para seleccionar secuencias con calidad superior a Q30, evaluar el porcentaje de GC, detectar la presencia de adaptadores y de secuencias duplicadas, y proceder a su limpieza.

Posteriormente, se realizó la depuración y filtrado de las secuencias. La eliminación de adaptadores de Illumina presentes en las secuencias (F: CCTACGGGNGGCWGCAG; R: GACTACHVGGGTATCTAATCC), así como el recorte de bases de baja calidad (trimming), se llevó a cabo utilizando el programa Cutadapt v4.0 (Martin, 2011). El ensamblaje de *novo* de los genomas presentes en las nueve cepas se llevó a cabo utilizando SPAdes v2.4.0 (Prjibelski et al., 2020) y metaSPAdes v3.15.3 (Nurk et al., 2017). Para la eliminación de secuencias duplicadas se utilizó bbmap v39.81 (Bushnell, 2017), sin embargo, no se eliminaron todas las deduplicaciones solo si sobrepasaban el 20% de deduplicaciones por secuencia, ya que en estudios metagenómicos, la eliminación indiscriminada de lecturas duplicadas en genomas no complejos puede conducir a una subestimación de la abundancia biológica real, ya que una proporción de estas corresponde a duplicados

naturales derivados de la cobertura y dinámica poblacional (Niu et al., 2010; Zhang et al., 2023).

Se evaluó la contaminación por ADN bacteriano utilizando ViromeQC v1.0.2 (Zolfo et al., 2019). Se seleccionaron únicamente aquellas muestras con un nivel de contaminación por ADN bacteriano inferior al 1%.

La búsqueda de secuencias relacionadas con bacteriófagos se realizó utilizando FastViromeExplorer v1.3., para lo cual se ocuparon los parámetros preestablecidos, se analizaron lecturas pareadas en formato fastq y el índice generado fue a partir de la base de dato “ncbi-viruses-list.txt”, según las instrucciones del programador (Tithi et al., 2018).

En los contigs ensamblados se realizó la búsqueda de genes de virulencia y genes de resistencia antimicrobiana empleando la paquetería ABRicate GPLv2 (Seemann, 2023), empleando como referencias las bases de datos VFDB (Chen et al., 2016), Ecoli_VF (Ingle et al., 2016), NCBI AMRFinderPlus (Feldgarden et al., 2021), CARD (Alcock et al., 2023), Resfinder (Bortolaia et al., 2020) y PlasmidFinder (Carattoli, 2014). Asimismo, se utilizó la base de datos construida “proteinafagos” (ver Capítulo 2 Materiales y Métodos).

Para el procesamiento y visualización de los resultados derivados de la búsqueda de genes de virulencia, genes de resistencia, y genes asociados a proteínas de bacteriófagos y especies virales fueron analizados en Python 3 con las librerías pandas (Mackinney, 2010), NumPy (Harris et al., 2020), matplotlib (Hunter, 2007) y seaborn (Waskom, 2021). Los mapas de calor se construyeron a partir del número de genes de resistencia, genes de virulencia o genes asociados a proteínas de bacteriófagos, presentes en cada cepa. Se tomaron a consideración aquellos genes que tuvieran coberturas con respecto a los genes de referencia por encima del 90% y similitudes con respecto a los genomas de referencias por encima del 90%.

Análisis ecológico. Las abundancias relativas de especies de bacteriófagos se calcularon a partir del número de lecturas mapeadas contra los genomas de referencia de la base de datos utilizada, en este caso *ncbi-viruses-list.txt*. Las lecturas mapeadas se consideraron como una estimación del número de individuos para cada una de las especies presentes en cada cepa, observándose variaciones en el número de lecturas entre especies dentro de cada muestra. Posteriormente, el total de lecturas mapeadas por cepa se tomó como el 100% de los individuos, lo que permitió calcular la abundancia relativa de cada una de las especies de bacteriófagos presentes en cada cepa.

Para el cálculo de abundancias y el desarrollo de gráficas se utilizó Python 3 con las librerías pandas 2.3.3 (Mackinney, 2010), NumPy 2.4.4 (Harris et al., 2020), matplotlib 3.10.8 (Hunter, 2007) y seaborn 0.13.2 (Waskom, 2021) para el procesamiento y visualización de datos.

A partir de las especies de bacteriófagos identificadas mediante el análisis genético de las nueve cepas, se evaluó la diversidad α por cepa utilizando los índices de Shannon y Simpson, con el objetivo de estimar la riqueza y la abundancia relativa de las especies de bacteriófagos presentes en cada cepa.

Además, se analizó la diversidad β mediante el índice de Jaccard, con la finalidad de evaluar la disimilitud entre las cepas con base en la presencia o ausencia de especies de bacteriófagos.

Por último, se realizó un análisis de metacomunidades para evaluar la distribución de las distintas especies por sitio, es decir, su coherencia, considerando su presencia y ausencia dentro de una matriz de metacomunidad. Asimismo, se midió el recambio de especies entre

cada unidad de muestreo y su distribución dentro de la matriz. Finalmente, se calculó el índice de agrupamiento de las especies dentro de la matriz de la metacomunidad, de acuerdo con la metodología propuesta por Leibold y Mikkelsen (2002). Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con un valor de $*p \leq 0.05$).

En este caso, las cepas constituyen la unidad de muestreo, en las cuales se analiza la presencia y distribución de especies de bacteriófagos. Este análisis permitió establecer la estructura y composición de la metacomunidad de bacteriófagos asociada a las nueve cepas estudiadas.

Para el análisis de la diversidad α y β se utilizó RStudio 4.4.1 utilizando las librerías BiodiversityR v2.16-1 (Kindt y Coe, 2005) y betapart v1.6 (Baselga et al., 2023), con los cuales se generaron los índices de Shannon y Simpson (1-D), además del dendrograma resultante del cálculo del índice de similitud de Jaccard. Para el análisis y la visualización de las metacomunidades se utilizó metacom 1.5.3 (Dallas, 2014), vegan v2.6-6.1 (Oksanen et al., 2024), dbplyr v2.5.0 (Wickham et al., 2024) y ggplot2 3.5.1 (Wickham, 2016).

Resultados

Análisis de abundancia.

Los pellets virales recuperados y secuenciados de las nueve cepas inducidas con mitomicina C presentaron un rango de 8,521,641 a 22,552,172 secuencias pareadas, con calidades entre Q20 y Q30, longitudes de 149 pb y porcentajes de secuencias deduplicadas entre 11.84% y 63.44%. Se realizó una depuración de secuencias; sin embargo, no se eliminaron todas las secuencias deduplicadas (ver Metodología). Posterior a la depuración, se trabajó con un rango entre 7,023,428 y 10,100,482 secuencias pareadas, con calidades superiores a Q30, longitudes de secuencia de 120–149 pb y porcentajes de GC de 49% a 54%, además de un porcentaje de secuencias deduplicadas entre 8.01% y 18.48% (Tabla suplementaria 1).

Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas, generando un rango de 17,199 a 202,385 secuencias contiguas, donde la cepa con mayor número de secuencias contiguas fue la cepa Coy 3-19 (proveniente de un coyote) y la cepa con menor número fue la cepa B-26 Coy 6 (aislada de un bisonte) (Cuadro 1). Una vez obtenidas secuencias de buena calidad, se realizó el análisis metagenómico para identificar las especies de bacteriófagos presentes en las nueve cepas mediante FastViromeExplorer v1.3.; se detectó un total de 82 especies de bacteriófagos distribuidas entre las nueve cepas, con distintas abundancias de lecturas mapeadas, de las cuales se eliminaron aquellas con valores menores a 100. Como resultado, se obtuvo un total de 49 especies de bacteriófagos distribuidas en las nueve cepas de *E. coli* PGV (Tabla suplementaria 2). Estos 49 bacteriófagos están distribuidos en 180 secuencias contiguas presentes en las nueve cepas de EPGV.

Cuadro 1. Parámetros de calidad de las secuencias ensambladas de los bacteriófagos recuperados de sobrenadantes después de la inducción con mitomicina C. Se muestran las métricas de ensamblaje obtenidas a partir de lecturas metagenómicas de sobrenadantes virales inducidos con mitomicina C. Para cada biblioteca se reporta la longitud total del ensamblaje, contenido GC, número de marcadores presentes, completitud, redundancia, número de secuencias contiguas, así como los valores de N50 y L50. Los ensamblajes se generaron utilizando metaSPAdes v.3.15.3, seguido de la evaluación de calidad genómica con herramientas bioinformáticas estándar para genomas virales.

Biblioteca	Longitud total	Contenido CG	Marcadores presentes	Integridad	Redundancia	Secuencias contiguas	N50	L50
B2-	6,926,613	66.84	102	0.9714	1.0816	36,060	6,321	16

31(2)33_ S9_meta spades_s caffolds_ 1								
B26(2)3_ S3_meta spades_s caffolds_ 1	8,253,051	67.22	104	0.9905	1.0192	60,114	40,749	76
B26(6)6_ S6_meta spades_s caffolds_ 1	25,209,704	67.21	103	0.9143	1.1364	189,197	156,918	9
B26(6)31_ S8_met aspades_ scaffolds_ 1	10,550,306	55.92	104	0.9905	1.1364	39,681	32,685	11
B16(1)32_ S2_met aspades_ scaffolds_ 1	5,073,901	62.87	101	0.9619	1.0198	54,971	2,233	331
Coy 3_19_S4_ metaspa des_scaff olds_1	26,140,788	50.92	105	0.9714	1.8952	202,385	39,588	24
Meph 15- 28_S5_m etaspade s_scaffol ds_1	30,610,425	62.75	105	0.9714	1.3529	92,291	40,552	41
B-26 Coy 6_metaes pades_sc affolds_1	5,204,031	49.17	103	0.9905	1.092	17,199	4,474	254
B2- 31(2)36_ metaespa des_scaff olds_1	8,781,450	57.64	96	0.9714	1.072	28,324	9,208	304

Se analizó el orden viral al cual pertenecen las 49 especies de bacteriófagos detectados en las nueve cepas, observándose que el orden Caudoviricetes (actualmente Caudovirales) fue el predominante, con abundancias relativas entre 75% y 100%. En las cepas Meph15-28

(zorrillo), Coy 3-19 (coyote), 26-B Coy 6 (coyote) y B16(1)32 (bisonte), todas las especies de bacteriófagos identificadas fueron asignadas al orden Caudovirales, con una abundancia relativa del 100%. De estas, las cepas Meph 15-28, Coy 3-19 y 26-B Coy 6 corresponden a aislamientos provenientes de distintos carnívoros, mientras que la cepa B16(1)32 se obtuvo de un bisonte.

En las cepas B26(2)3 (bisonte), B26(6)31 (bisonte), B26(6)6 (bisonte) y B2-31(2)33 (bisonte), la abundancia del orden Caudovirales osciló entre el 75% y el 97%; sin embargo, el porcentaje restante no pudo ser clasificado dentro de ningún orden taxonómico. Cabe destacar que estas cepas provienen exclusivamente de dos bisontes: un individuo del cual se obtuvieron tres cepas y otro del que se aislaron dos cepas (Figura suplementaria 1).

El análisis de la abundancia de las familias presentes en los 49 bacteriófagos inducidos con mitomicina C en las nueve cepas de EPGV mostró que las principales familias detectadas fueron Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae (Familias abolidas desde el 2023, presentes en la base de datos de FastViromeExplorer v1.3.), con abundancias variables entre cepas. La familia Siphoviridae estuvo presente en las nueve cepas, con rangos de 1% a 98%; Myoviridae estuvo presente en siete cepas, con rangos de 1% a 99%; y Podoviridae se detectó en cuatro de las nueve cepas, con rangos de 7% a 97%. En las cepas B26(2)3, B26(6)31, B26(6)6 y B2-31(2)33 se encontraron lecturas de secuencias contiguas sin asignación a alguna familia de bacteriófagos (Figura 2 suplementaria).

El análisis de la presencia y abundancia de los distintos géneros virales en los 52 bacteriófagos inducidos con mitomicina C mostró la presencia de siete géneros con abundancias variables. El género *Lambdavirus* estuvo presente en las nueve cepas, con porcentajes de abundancia entre 2.53% y 96.53%, siendo el género predominante en las cepas Meph 15-28, B26(2)3, B2-31(2)36, B26(6)6, B26(6)31 y B2-31(2)33 (Cuadro 2; Figura 3 suplementaria).

El género *P2virus* se encontró en seis cepas (26-B Coy 6, B26(1)32, B26(6)31, B26(6)6, Coy3-19 y Meph 15-28), con abundancias entre 0.91%, 73.39%. El género *Pocjvirus* se detectó en cinco cepas (Meph 15-28, B2-31(2)33, B26(6)6, B26(6)31 y 26B-Coy 6), con abundancias de 0.01, 0.58, 1.72, 3.16 y 33.80%, respectivamente. El género *Nona33virus* estuvo presente en cinco cepas (26B-Coy 6, B26(6)31, B26(6)6, B2-31(2)33 y Coy3-19), con abundancias de 0.02% a 5.51% (Cuadro 2; Figura 3 suplementaria).

En ocho de las nueve cepas se detectaron bacteriófagos sin asignación a género, con porcentajes entre 0.79% y 97.28% (Cuadro 2; Figura 3 suplementaria).

Cuadro 2. Distribución taxonómica de bacteriófagos a nivel de género en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se muestra el porcentaje de lecturas mapeadas asignadas a distintos géneros de bacteriófagos en cada una de las nueve cepas analizadas. La asignación taxonómica se realizó mediante FastViromeExplorer v1.3, utilizando la base de datos de referencia ncbi-viruses-list.txt. Los valores representan la abundancia relativa de lecturas mapeadas por género viral respecto al total de lecturas virales por muestra, incluyendo una categoría de lecturas no clasificadas (*Unclassified*).

Cepa/ Género	<i>Hp1virus</i>	<i>Lambdavirus</i>	<i>Nona33virus</i>	<i>P2virus</i>	<i>Phietavirus</i>	<i>Pocjvirus</i>	<i>Tl2011virus</i>	Sin clasificar
26-B Coy 6	0%	2.53%	0.02%	0%	0%	33.80%	57.11%	6.54%
B26(1)32	0%	19.96%	0%	73.39%	0%	0%	0%	6.65%
B26(2)3	0%	78.98%	0%	0%	0%	0%	0%	21.02%
B26(6)31	0%	57.56%	2.45%	04.08%	0.12%	3.16%	9.69%	22.93%

B26(6)6	0.36%	71.51%	5.51%	0.91%	0%	1.72%	0.17%	19.82%
B2-31(2)33	0%	59.13%	2.83%	0%	0%	0.58%	8.15%	29.30%
B2-31(2)36	0%	77.45%	0%	0%	0%	0%	0%	22.54%
Coy 3-19	0%	1.28%	0.02%	1.42%	0%	0%	0%	97.28%
Meph 15-28	0%	96.53%	0%	2.66%	0%	0%	0%	0.79%

El análisis de las secuencias contiguas mostró la presencia de 49 especies de bacteriófagos en las nueve cepas inducidas de *E. coli* PGV (Tabla suplementaria 2). Las abundancias relativas fueron variables; se graficaron abundancias mayores al 2% (Figura 1).

Las abundancias de las lecturas mapeadas para especies de bacteriófagos fue la siguiente: La cepa 26B-Coy 6 contiene 23 especies de fagos; entre las principales se encuentran: *Shigella phage* Ss-VASD (52.25%), *Shigella virus* POCJ13 (24.59%), *Shigella virus* 7502Stx (9.20%) y *Escherichia virus* PA2 (4.05%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B16(1)32 contiene 14 especies, entre las que destacan: *Escherichia phage* pro483 (73.28%), *Stx2-converting phage* 1717 (17.68%), *Enterobacteria phage* P88 (6.24%) y *Enterobacteria phage* BP-4795 (1.29%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B2-32(2)33 contiene 18 especies; las principales son: *Enterobacteria phage* HK630 (24.99%), *Enterobacteria phage* YYZ-2008 (24.85%), *Enterobacteria phage* BP-4795 (12.55%), *Enterobacteria phage* mEp460 (12.46%), *Stx2-converting phage* 1717 (8.12%), *Shigella virus* VASD (6.23%), *Stx2-converting phage* 86 (4.38%), *Escherichia virus* 933W (2.83%) y *Escherichia virus* TL2011 (1.37%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B2-32(2)36 contiene 8 especies; las principales son: *Enterobacteria phage* BP-4795 (56.36%), *Enterobacteria phage* YYZ-2008 (22.54%) y *Stx2-converting phage* 1717 (21.05%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B26(2)3 contiene 19 especies; entre las principales están: *Enterobacteria phage* BP-4795 (56.54%), *Enterobacteria phage* YYZ-2008 (19.02%), *Stx2-converting phage* 1717 (18.32%), *Enterobacteria phage* mEp460 (3.91%) y *Shigella phage* SflI (1.08%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B26(6)31 contiene 34 especies; las principales son: *Escherichia phage* HK639 (24.08%), *Shigella phage* SflV (14.07%), *Shigella virus* VASD (8.88%), *Escherichia virus* HK022 (8.60%), *Enterobacteria phage* BP-4795 (7.31%), *Stx2-converting phage* 1717 (4.98%), *Enterobacteria phage* YYZ-2008 (3.96%), *Enterobacteria phage* P4 (3.70%) y *Enterobacteria phage* mEp390 (3.66%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa B26(6)6 contiene 22 especies; las principales son: *Enterobacteria phage* BP-4795 (28.34%), *Stx2-converting phage* 1717 (19.82%), *Enterobacteria phage* HK629 (11.26%), *Escherichia virus* Lambda (10.01%) y *Enterobacteria phage* YYZ-2008 (9.19%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

La cepa Coy3-19 presentó 18 especies; las principales fueron: *Shigella phage* SflV (33.11%), *Shigella phage* SflI (28.09%), *Enterobacteria phage* SflV (21.07%) y *Enterobacteria phage* SflI (14.88%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

En la cepa Meph15-28 se encontraron 17 especies; las predominantes fueron *Escherichia virus* Lambda (94.20%) y *Enterobacteria phage* BP-4795 (1.25%) (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

Las abundancias relativas de lecturas mapeadas más altas de la metasecuenciación, corresponden a bacteriófagos que infectan bacterias entéricas, como *E. coli*, como los bacteriófagos *Shigella phage* Ss-VASD, *Escherichia phage* pro483, *Enterobacteria phage* HK630, *Enterobacteria phage* BP-4795, *Enterobacteria phage* BP-4795, *Escherichia phage* HK639, *Shigella phage* SfIV y *Escherichia virus* Lambda (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

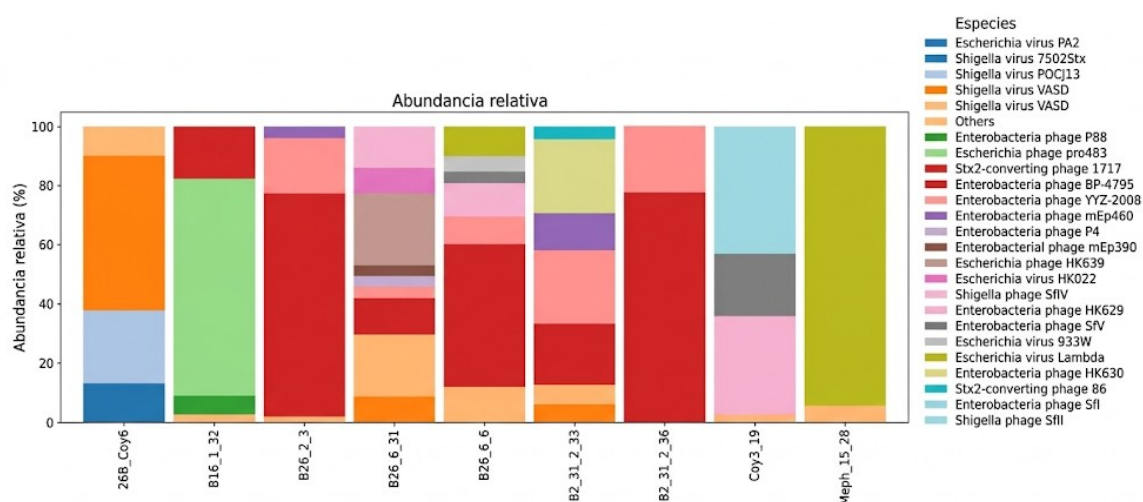


Figura 1. Abundancia relativa de especies de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Distribución de la abundancia relativa (%) de especies de bacteriófagos identificadas en nueve cepas de *E. coli* PGV tras inducción con mitomicina C. Las lecturas obtenidas mediante secuenciación masiva fueron procesadas con FastViromeExplorer v1.3, utilizando la base de datos de referencia ncbi-viruses-list.txt. Cada color representa una especie distinta de bacteriófago, y la altura de los segmentos indica la proporción de lecturas mapeadas asignadas a cada especie dentro de cada cepa analizada.

La variación en las abundancias relativas entre las nueve cepas inducidas con mitomicina C permite analizar cada cepa como una unidad de muestreo distinta que comparte características con las demás. Para evaluar si se logró captar adecuadamente la diversidad de bacteriófagos mediante la inducción con mitomicina C en las cepas de *E. coli* PGV aisladas de fauna silvestre, se realizó una curva de rarefacción. En esta se observa el aumento de la riqueza de especies por unidad de muestreo, partiendo de una riqueza de 19.77 para la unidad de muestreo 1, con una desviación estándar (DE) de ± 6.61 ; mientras que, para la unidad de muestreo 8, se muestra una riqueza de 47.92 especies con una DE de ± 2.75 . En el caso de la unidad de muestreo 9 se contemplan todas las especies de bacteriófagos detectadas por lo cual no presenta DE, debido a ser un valor exacto. Esto evidencia una mayor variabilidad al inicio del análisis que disminuye conforme aumenta la intensidad de muestreo; sin embargo, no se observa una fase de meseta, ya que la curva mantiene una pendiente positiva, lo que indica que, al incrementar el esfuerzo de muestreo, podrían incorporarse nuevas especies de bacteriófagos, con una tendencia a estabilizarse (Cuadro 3, Figura 4 suplementaria).

Cuadro 3. Datos de la curva de rarefacción de la riqueza de especies de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV. Se presentan los valores de riqueza de especies estimada a partir de una curva de rarefacción construida con las nueve cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C. La riqueza de especies corresponde al número acumulado de bacteriófagos detectados conforme aumenta el esfuerzo de muestreo (unidades de muestreo de 1 a 9). Se incluyen los valores de desviación estándar (DE $\pm$), calculados a partir de permutaciones del muestreo, los cuales disminuyen progresivamente conforme se incrementa el número de unidades, indicando una estabilización en la estimación de la riqueza hacia el final del muestreo.

Unidades de muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Riqueza de especies	19.78	28.92	34.80	38.81	41.74	44.02	45.92	47.56	49.00
DE±	6.61	6.99	6.69	6.20	5.59	4.90	4.02	2.75	0.00

El análisis de acumulación de especies mostró una mayor proporción de lecturas contiguas correspondientes a siete especies presentes en las nueve cepas: *Enterobacteria phage* BP-4795, *Escherichia virus* Lambda, *Enterobacteria phage* YYZ-2008, *Escherichia phage* pro483, *Shigella virus* VASD, *Stx2-converting phage* 1717 y *Enterobacteria phage* SfV (Figura 2A).

Mientras que el análisis por género (bisontes y carnívoros) evidenció que la proporción de lecturas asociadas a especies de bacteriófagos cambia al separar los grupos. En carnívoros, las especies predominantes fueron: *Shigella phage* Ss-VASD, *Shigella virus* POCJ13, *Shigella phage* SfIV, *Shigella phage* SfII, *Enterobacteria phage* SfV, *Shigella virus* 7502Stx y *Enterobacteria phage* Sfl. En bisontes, las principales fueron: *Enterobacteria phage* BP-4795, *Escherichia phage* pro483, *Stx2-converting phage* 1717, *Enterobacteria phage* HK630 y *Enterobacteria phage* mEp460 (Figura 2B).

En ambos casos, las especies de bacteriófagos que contribuyen a la diversidad de especies son los bacteriófagos *Shigella virus* VASD y *Enterobacteria phage* BP-4795, especies bacteriófagos que corresponden a bacteriófagos asociados a distintas enterobacterias y reportados con presencia del gen *stx2* (Carter et al., 2016; Creuzburg et al., 2011). En conjunto, estos resultados confirman que cada cepa aporta una proporción particular de bacteriófagos a la comunidad y funciona como un sitio capaz de albergar distintas especies (Figura 2B).

Composición de la comunidad de bacteriófagos

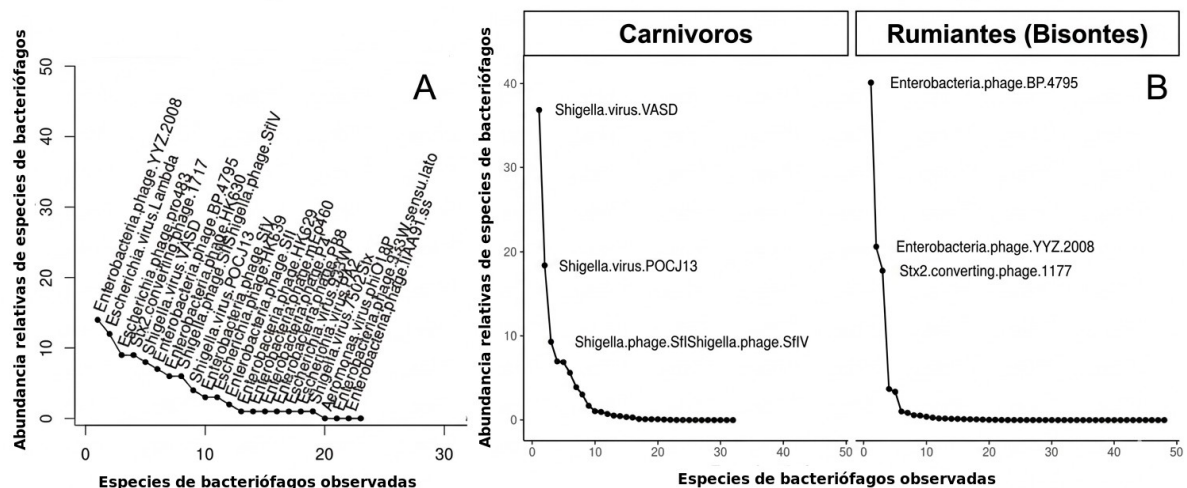


Figura 2. Abundancia acumulada relativa de especies de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C y su por orden. La figura muestra la estructura de las comunidades virales obtenidas tras la inducción con mitomicina C en nueve cepas silvestres de *E. coli* PGV. El mapeo de especies y la cuantificación de lecturas se realizaron mediante FastViromeExplorer v1.3. (A) Abundancia de especies en las nueve cepas de *E. coli* PGV: se representa la riqueza total de profagos activados. El eje Y corresponde a la abundancia relativa (% de lecturas mapeadas) y el eje X a las especies de bacteriófagos identificadas. (B) Abundancia de especies de bacteriófagos agrupadas orden (carnívoros vs. rumiantes/bisontes): se muestra la distribución rango–abundancia de los bacteriófagos inducidos, evidenciando diferencias en la contribución relativa de los órdenes evaluados.

Análisis de diversidad α , β y metacomunidad

Se evaluaron por cada cepa, como unidad de muestreo, que aporta un conjunto particular de especies de bacteriófagos a la comunidad —y, por ende, presenta una diversidad distinta—, los índices de diversidad de Shannon-Wiener y de Simpson. Asimismo, con el objetivo de determinar si las distintas cepas comparten especies de bacteriófagos, se calculó el índice de similitud de Jaccard.

Las cepas que mostraron mayor diversidad de especies tras la inducción con mitomicina C fueron B26(6)31, con un valor de Simpson de 0.8910 y un valor de Shannon de 2.6298; seguida de la cepa B26(6)6, con un valor de Simpson de 0.8432 y un valor de Shannon de 2.1969; y, en tercer lugar, la cepa B2-31(2)33, con un valor de Simpson de 0.8308 y un valor de Shannon de 2.0043 (Cuadro 4).

Estos resultados indican que, si bien estas tres cepas presentan una mayor diversidad, esta puede considerarse moderada. En ellas no se observa una marcada dominancia de algunas especies ni una presencia relevante de especies raras o únicas. Lo anterior se interpreta considerando que, para el índice de Simpson, valores mayores a 3 indican alta diversidad, influenciada por la presencia de especies raras; mientras que, en el índice de Shannon, valores cercanos a 1 representan una diversidad alta, ya que este índice es sensible tanto a la dominancia como a la equidad de las especies.

Cuadro 4. Índices de diversidad α por cepa de *Escherichia coli* PGV. Se calcularon los índices de diversidad de Shannon–Weaver y Simpson para cada cepa de *E. coli* PGV con el objetivo de evaluar la diversidad de especies de bacteriófagos presentes en cada comunidad viral. Cada cepa fue considerada como un sitio independiente con una estructura comunitaria particular. Los valores obtenidos permiten comparar la diversidad entre cepas e inferir la posible dominancia de especies específicas de bacteriófagos dentro de cada comunidad.

Cepas de <i>E. coli</i> PGV	26B-Coy 6	B16(1)32	B2-31(2)33	B2-31(2)36	B26(2)3	B26(6)31	B26(6)6	Coy 3-19	Meph 15-28
Índice de Shannon	1.4947	0.8438	2.0043	1.0600	1.1397	2.6298	2.1969	1.4802	0.3592
Índice Simpson	0.6552	0.4275	0.8308	0.6007	0.6002	0.8910	0.8432	0.7476	0.1121

Además, dos de estas cepas provienen del mismo individuo y las tres pertenecen a bisontes, lo que sugiere la posibilidad de que las cepas provenientes de bisontes —o, en general, de rumiantes— aporten una mayor diversidad de bacteriófagos a la comunidad,

aunque con cierta predominancia de algunas especies, entre ellas *Enterobacteria phage BP 4795*, *Stx2 converting phage 1717* y *Enterobacteria phage YYZ 2008* (Figura 1).

Las cepas que mostraron menor diversidad tras la inducción con mitomicina C fueron Meph15-28, con un valor de Simpson de 0.1121 y un valor de Shannon de 0.3592, y B16(1)32, con un valor de Simpson de 0.4275 y un valor de Shannon de 0.8438. Estas cepas provienen de un carnívoro (zorrillo listado) y de un bisonte, respectivamente (Cuadro 3).

Estos resultados indican que en dichas cepas existe una mayor dominancia de especies. Tal es el caso de la cepa Meph15-28, cuya abundancia está dominada por *Escherichia virus Lambda*. Por su parte, en la cepa B16(1)32, la abundancia está determinada principalmente por tres especies de bacteriófagos: *Escherichia phage pro483*, *Enterobacteria phage BP4795* y *Enterobacteria phage P88* (Figura 1).

En conjunto, estos resultados sugieren que cada cepa de *E. coli* PGV podría diferir en su capacidad de albergar fagos. Asimismo, no se descarta la posibilidad de que la mitomicina C haya inducido únicamente algunas especies de bacteriófagos en estas cepas.

Para evaluar la diversidad beta, se utilizó el índice de Jaccard con el fin de analizar la similitud en la composición de especies de bacteriófagos dentro de la comunidad de cepas de *E. coli* PGV. Con los resultados de los índices de Jaccard (Cuadro 5) se construyó un dendrograma de similitud donde se observa que, aunque las cepas difieren en su diversidad alfa, comparten especies de bacteriófagos entre sí, agrupándolos en dos grandes grupos (Figura 3).

Cuadro 5 | Índice de similitud de Jaccard entre cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se presenta la matriz de similitud basada en el índice de Jaccard, el cual cuantifica el grado de coincidencia en la composición de especies de bacteriófagos entre pares de cepas de *E. coli* PGV. Los valores van de 0 a 1, donde 1 indica identidad completa en la composición de especies compartidas y 0 ausencia total de especies en común. La matriz permite evaluar la similitud estructural entre comunidades virales inducidas en cada cepa, evidenciando patrones de compartición diferencial de bacteriófagos entre las distintas muestras analizadas.

	26B-Coy 6	B2-31(2)33	B2-31(2)36	B26(2)3	B26(6)6	B26(6)31	B16(1)32	Coy 3-19	Meph 15-28
26B-Coy 6	1.000	0.458	0.267	0.520	0.429	0.375	0.320	0.571	0.323
B2-31(2)33	0.458	1.000	0.292	0.429	0.500	0.423	0.320	0.423	0.240
B2-31(2)36	0.267	0.292	1.000	0.222	0.267	0.188	0.176	0.222	0.143
B26(2)3	0.520	0.429	0.222	1.000	0.500	0.345	0.286	0.429	0.286
B26(6)6	0.429	0.500	0.267	0.500	1.000	0.429	0.286	0.500	0.273
B26(6)31	0.375	0.423	0.188	0.345	0.429	1.000	0.240	0.345	0.200
B16(1)32	0.320	0.320	0.176	0.286	0.286	0.240	1.000	0.286	0.250

Coy 3-19	0.571	0.423	0.222	0.429	0.500	0.345	0.286	1.000	0.286
Meph 15-28	0.323	0.240	0.143	0.286	0.273	0.200	0.250	0.286	1.000

El primer grupo está conformado por las cepas 26B-Coy 6 y Coy 3-19. Estas dos cepas comparten una mayor similitud entre sí, a una distancia de 0.4, en comparación con las demás cepas. Este grupo agrupa a 7 cepas, lo que indica que comparten especies de bacteriófagos entre sí, sugiriendo que han estado en contacto con las mismas especies de bacteriófagos. A su vez, este grupo se subdivide en tres subgrupos: el primero, integrado por B2-31(2)33 y Meph 15-28; el segundo, por B2-31(2)36 y B26(6)6; y el tercero, por B26(2)3, B26(6)31 y B16(1)32 (Figura 3).

Además, las cepas B2-31(2)36 y B26(6)6 son las que presentan mayor similitud, con una distancia < 0.2 . Es muy probable que estas cepas compartan casi las mismas especies de bacteriófagos (Figura 3). De igual forma, las cepas B26(6)31 y B16(1)32 generan un subgrupo que comparte una distancia cercana a 0.1. Cabe destacar que las cepas B26(6)6 y B2-31(2)36 provienen de dos bisontes distintos, al igual que las cepas B26(6)31 y B16(1)32 (Figura 3). Las cepas B2-31(2)33 y Meph15-28, aunque pertenecen al segundo grupo, muestran una divergencia propia, lo que indica que poseen fagos únicos que las separan de los subgrupos presentes en este grupo; entre ellas comparten una similitud con una distancia cercana a 0.2. La cepa B2-31(2)33 pertenece a un bisonte y la cepa Meph15-28 a un zorrillo (Figura 3).

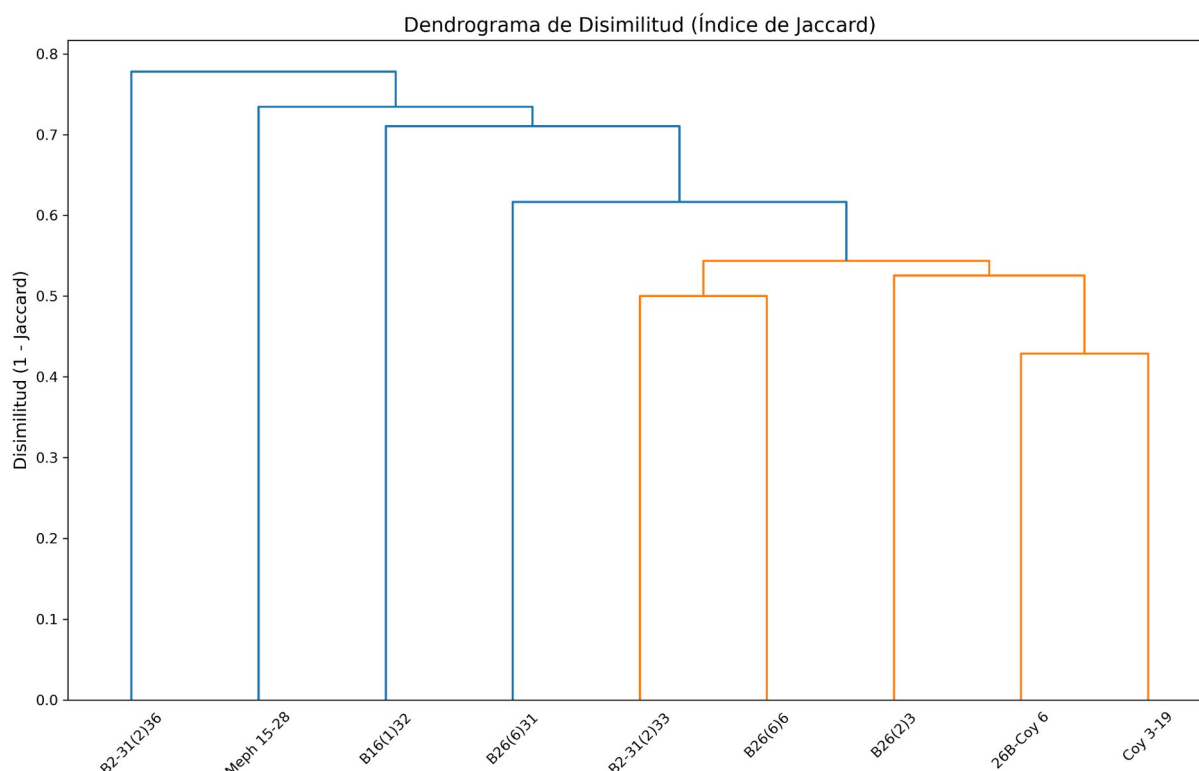


Figura 3. Dendrograma de disimilitud de especies de bacteriófagos compartidas entre cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se analizó la β -diversidad en términos de disimilitud de especies de bacteriófagos presentes en nueve cepas de *E. coli* PGV utilizando el índice de Jaccard. El dendrograma compara la composición de las comunidades virales liberadas tras la inducción con mitomicina C, identificadas mediante FastViromeExplorer v1.3. El eje vertical representa la distancia de disimilitud, donde valores más cercanos a 1 indican la menor coincidencia en la composición de especies de bacteriófagos entre las cepas analizadas.

Esta agrupación indica que, a pesar de tratarse de cepas distintas de *E. coli* PGV, e incluso de provenir de diferentes géneros y especies animales, comparten ciertas especies de bacteriófagos. Además, la presencia de algunas especies de bacteriófagos parece agruparse según la especie hospedadora, considerando que las cepas provienen de una misma región geográfica. Asimismo, algunas cepas presentan bacteriófagos que podrían considerarse elementos únicos dentro de su diversidad viral.(Figura 3).

Estos resultados abren la posibilidad de que las cepas de *E. coli* PGV se comporten como una metacomunidad, en la cual las especies de bacteriófagos pueden movilizarse entre distintas cepas y entre diferentes órdenes.

Se realizó un análisis de matriz de metacomunidades, en el cual se observó que los bacteriófagos presentes en las cepas muestran coherencia, entendida como el cálculo numérico de las ausencias presentes (Abs) en una matriz ordenada, comparado con el valor observado en una distribución nula de ausencias presentes generada a partir de matrices simuladas, según lo propuesto por Leibold y colaboradores (2004). El análisis mostró un valor de $Z < -1.96$ y una significancia de $p < 0.0008$, lo que sugiere que las comunidades presentan un mayor número de Abs de especies de lo esperado bajo un modelo de distribución ideal, indicando cierta independencia entre ellas, posiblemente influenciada por factores locales, como la competencia entre especies de bacteriófagos (Figura 4).

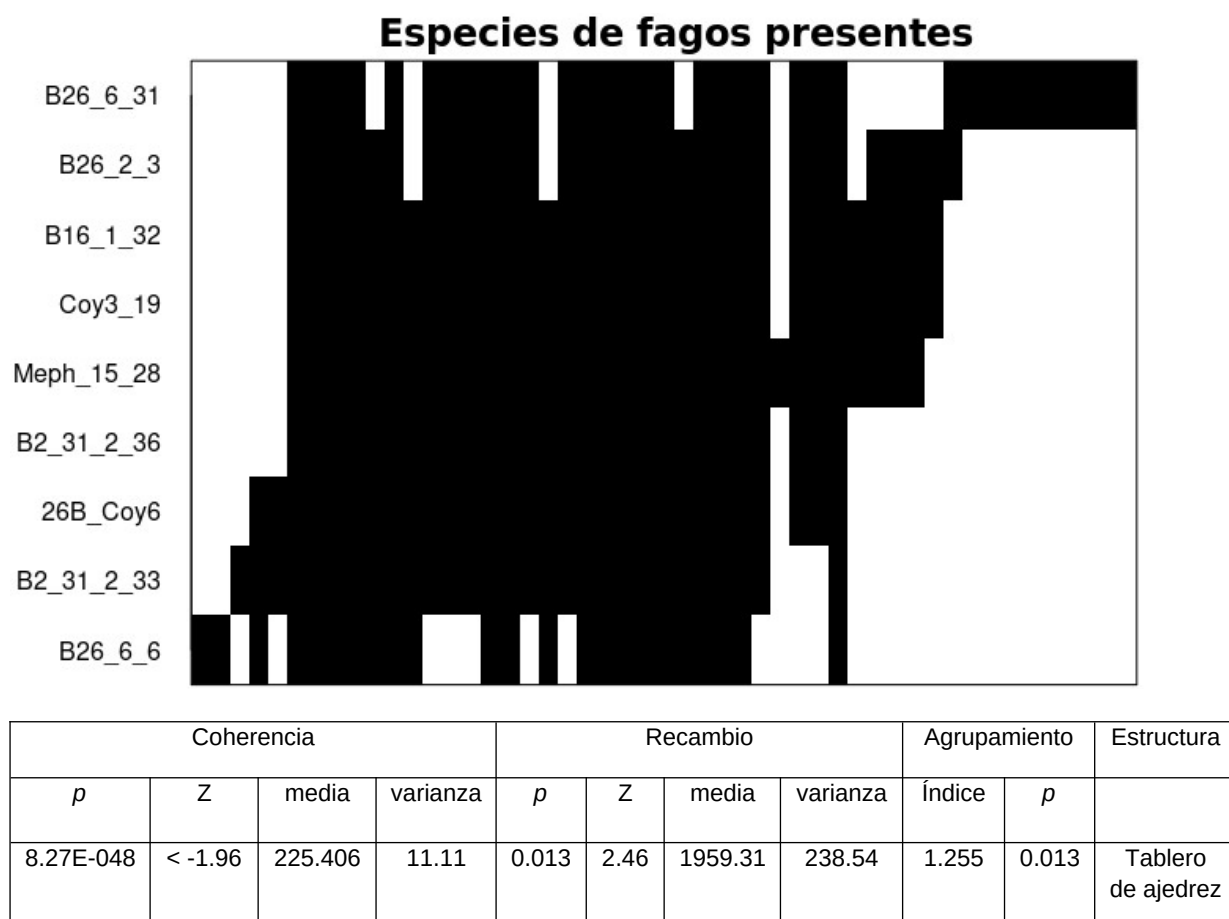


Figura 4. Análisis de la Metacomunidad de bacteriófagos presentes en las nueve cepas de *E. coli* PGV. Diagrama de la matriz de presencia/ausencia de especies de bacteriófagos. En el eje de la "x" se distribuyen las especies de bacteriófagos, en el eje de las "y" las nueve cepas donde se distribuyen las especies de bacteriófagos. Las celdas negras indican presencia y las blancas ausencia. La matriz ha sido reordenada automáticamente para minimizar las discrepancias y revelar la estructura subyacente de la metacomunidad por el método de modelo nulo (r1) con la función Metacommunity de metacom v1.5.3. en RStudio v4.4.1. Tabla de

Parámetros Estadísticos. Resumen de los resultados de las pruebas de aleatorización para evaluar la coherencia, el recambio y el agrupamiento.

Este patrón de distribución se le conoce como tablero de ajedrez, donde las especies son mutuamente excluyentes, recalcando la idea de competencia intraespecífica entre las distintas especies de bacteriófagos.

De igual forma se analizó el recambio y el agrupamiento de la metacomunidad como lo proponen Heino y colaboradores (2015). Esta metacomunidad con patrón de tablero de ajedrez presentó un recambio de especies de bacteriófagos con valor de distribución $Z = 2.46$ y una significancia de $p \leq 0.013$, lo que sugiere que algunas especies de bacteriófagos pueden ser reemplazadas siguiendo patrones estructurados entre las cepas que conforman la metacomunidad. Asimismo, se observó un índice de agrupación de 1.255 con una significancia de $p \leq 0.013$. Estos resultados sugieren la existencia de interacciones competitivas y excluyentes con cierto grado de recambio por grupos de especies de bacteriófagos en respuesta a la presencia de distintas especies de bacteriófagos entre las distintas cepas que integran la metacomunidad (Figura 4).

Es posible que esta dinámica condicione el flujo de material genético entre algunas cepas de *E. coli* mediante THG, favoreciendo que ciertos FV y GRA sean compartidos entre distintas cepas. En contraste, otras cepas de *E. coli* PGV podrían presentar perfiles diferentes de FV y GRA. Por ello, se analizó la presencia de FV y GRA en las secuencias de bacteriófagos identificadas en las nueve cepas de *E. coli*.

Presencia de FV y GRA

Se analizó la presencia de factores de virulencia (FV) en las secuencias contiguas ensambladas de los genomas virales de las nueve cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C. En los bacteriófagos presentes en estas cepas se identificaron 409 genes asociados a FV. Las secuencias fueron filtradas y se seleccionaron únicamente aquellas con coberturas y similitudes mayores al 90% respecto a las secuencias reportadas en las bases de datos VFDB y Ecoli_VF en ABRicate, obteniéndose un total de 279 FV en los bacteriófagos de las nueve cepas de *E. coli* PGV.

Dentro de los FV identificados se encontraron: operones fimbriales, colicinas, factores quimiotácticos, proteínas del sistema de secreción tipo III (SSTIII), proteínas translocadoras, toxinas tipo Shiga, toxinas citotóxicas, chaperonas, proteínas efectoras del SSTIII y genes asociados a islas de patogenicidad (Tabla suplementaria 3, Figura 5).

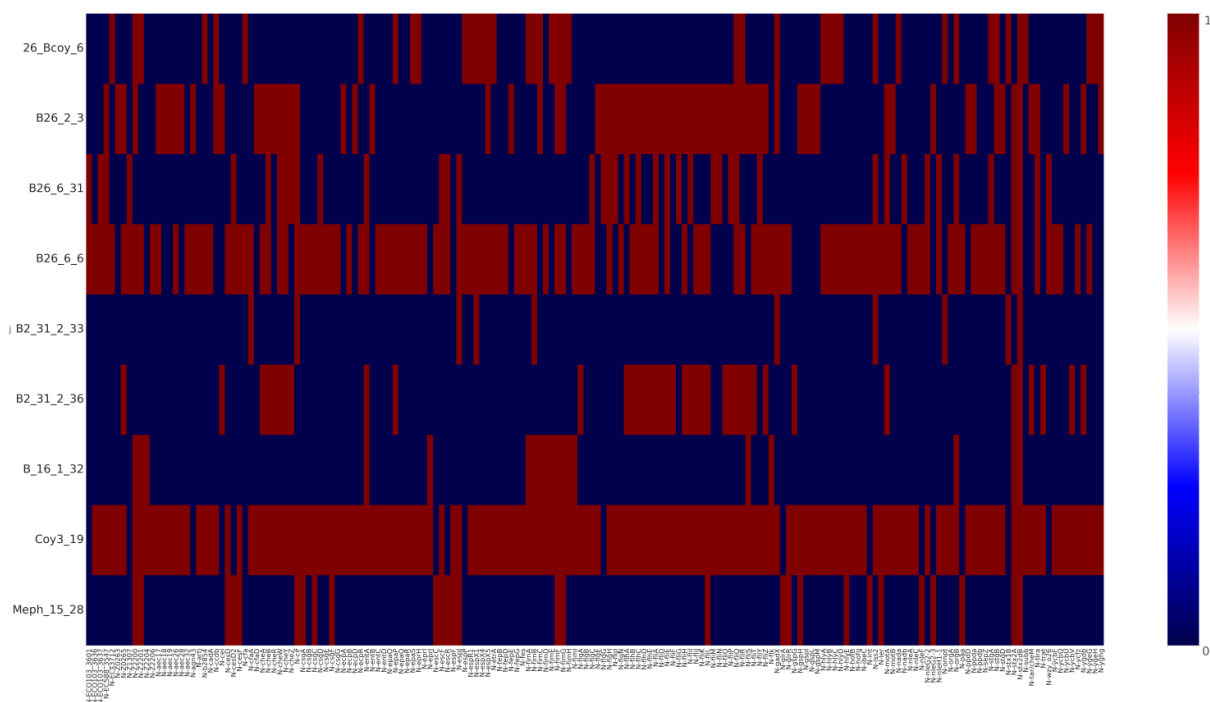


Figura 5. Mapa de calor de FV asociados a bacteriófagos inducidos con mitomicina C en nueve cepas de *E. coli* PGV. La identificación de FV se realizó mediante ABRicate GPLv2 empleando las bases de datos VFDB y Ecoli_VF. Se consideraron únicamente genes con $\geq 90\%$ de cobertura y similitud respecto a las secuencias de referencia. Para la construcción del mapa de calor se incluyeron exclusivamente los factores de virulencia compartidos por al menos dos cepas. En el eje X se representan los factores de virulencia identificados y en el eje Y las cepas de *E. coli* PGV donde se distribuyen. La escala de color indica presencia (rojo, valor = 1) o ausencia (azul, valor = 0) de los FV.

Se analizaron los factores de virulencia (FV) presentes en las secuencias de bacteriófagos inducidos y compartidos entre las nueve cepas de *E. coli* PGV, con la finalidad de evaluar si su distribución podría relacionarse con la metacomunidad de especies de bacteriófagos presentes en dichas cepas. Entre los FV identificados en los genomas de los bacteriófagos destacan las Shigatoxinas, presentes en las nueve cepas; algunos operones fimbriales compartidos entre seis de las nueve cepas (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* y *fimH*); genes asociados al sistema de secreción, como *epaO-S*, *eprHI*, *escCFR* y *espFIP*, presentes en seis cepas; el gen *cif* (ciclomodulina), detectado en cinco cepas; el gen *fliL*, asociado al locus flagelar; y los genes *Z2200* y *Z2201*, correspondientes a operones de la isla O de EHEC O157, presentes en seis y cinco cepas, respectivamente. Algunos FV se identificaron como exclusivos de ciertas cepas (Figura 5).

Se observó que las secuencias de algunos genes asociados a operones fimbriales (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* y *fimH*) se encuentran dispuestas en tándem, de acuerdo con las posiciones de inicio y término de cada gen dentro de una misma secuencia contigua de bacteriófago (Tabla suplementaria 3).

Las secuencias de bacteriófagos inducidos con mayor número de FV correspondieron a las cepas Coy 3-19, B26(6)6 y B26(2)3, con 172, 133 y 77 FV, respectivamente. En contraste, las secuencias de bacteriófagos inducidos con menor número de FV correspondieron a las cepas B2-31(2)33, B16(1)32 y Meph 15-28, con 10, 22 y 28 FV, respectivamente (Figura 5; Tabla suplementaria 3). Estos resultados, en conjunto con lo observado en la diversidad β , donde algunas cepas mostraron similitud —como B26(6)6 y B26(2)3, así como B2-31(2)33 y Meph 15-28 (Figura 3)—, sugieren la posibilidad de que las cepas que comparten FV hayan adquirido dichos genes mediante transferencia horizontal de genes (THG) mediada por bacteriófagos.

Además, en relación con el patrón de tablero de ajedrez observado en la metacomunidad de especies de bacteriófagos presentes en las nueve cepas (Figura 4), algunas cepas con menor número de especies de bacteriófagos, como Coy 3-19 y B26(2)3 (Figura 1), presentaron un mayor número de FV. En contraste, cepas como Meph 15-28, cuya diversidad estuvo representada principalmente por *Escherichia virus Lambda*, mostraron un menor número de FV ($n = 10$). En conjunto, estos resultados sugieren que el número de FV presentes en los genomas virales podría estar asociado con la estructura de la metacomunidad, favoreciendo que algunas cepas alberguen más o menos FV debido a posibles relaciones de competencia y exclusión entre distintas especies de bacteriófagos.

De igual forma, se analizó la presencia de genes de GRA en las secuencias de bacteriófagos inducidos con mitomicina C en las nueve cepas de *E. coli* PGV. Se detectaron inicialmente 122 GRA entre los bacteriófagos presentes en las nueve cepas; posteriormente, las secuencias fueron filtradas y se seleccionaron aquellas con coberturas y similitudes mayores al 90% respecto a las secuencias reportadas en la base datos NCBI AMRFinderPlus, CARD, Resfinder y PlasmidFinder en ABRicate, obteniéndose un total de 59 GRA que cumplieran estos criterios (Figura 6; Tabla suplementaria 4).

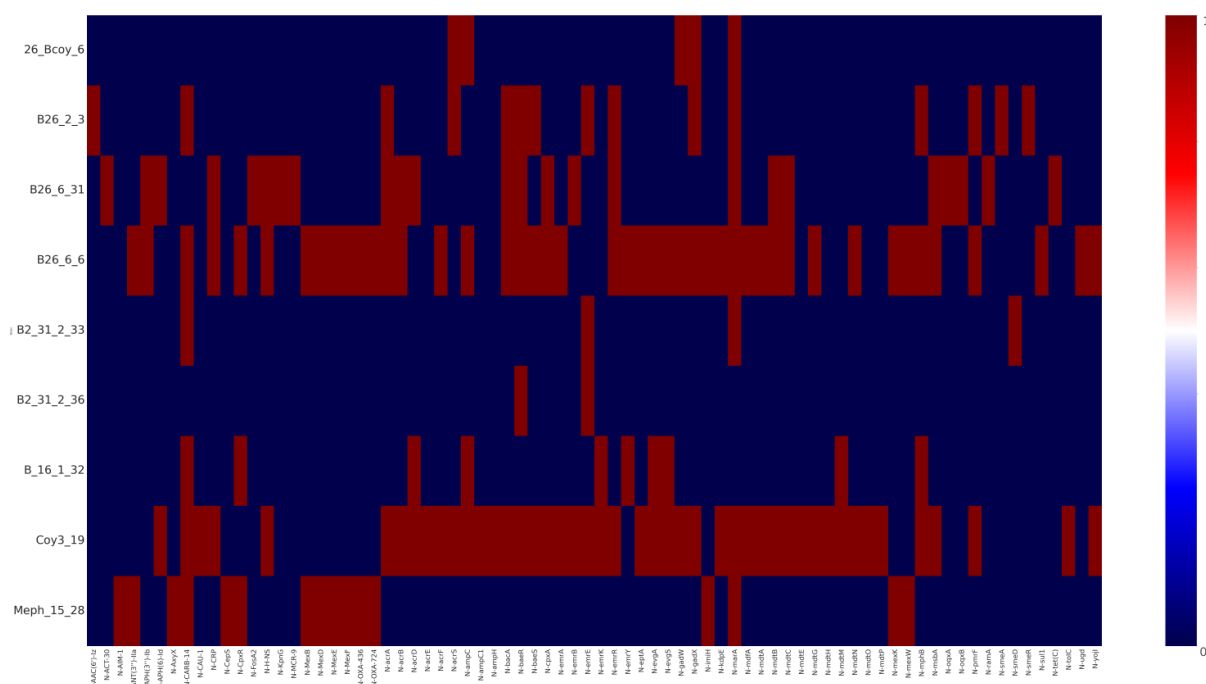


Figura 6. Mapa de calor de genes relacionados con resistencia a antimicrobianos (GRA) presentes en bacteriófagos de cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se analizó la presencia de genes relacionados con resistencia a antimicrobianos (GRA) en las secuencias de bacteriófagos inducidos con mitomicina C en nueve cepas de *E. coli* PGV. La detección de GRA se realizó mediante ABRicate GPLv2, utilizando las bases de datos NCBI AMRFinderPlus, CARD y PlasmidFinder. Solo se GRA presentes aquellos cuyas secuencias tuviesen coberturas y similitudes $\geq 90\%$ respecto a las secuencias reportadas en las bases de datos. Para la construcción del mapa de calor se incluyeron únicamente los GRA compartidos en al menos dos cepas. En el eje X se representan los genes relacionados con resistencia a antimicrobianos, mientras que en el eje Y se muestran las cepas de *E. coli* PGV donde estos se distribuyen. La escala de color indica presencia (rojo, valor = 1) o ausencia (azul, valor = 0) de los GRA.

Entre los genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) identificados se encontraron genes asociados con resistencia a ampicilina, bombas de flujo, beta-lactamasas, multirresistencia (Mdt), resistencia a aminoglucósidos, nitrofuranos, quinolonas y cefalosporinas, así como genes relacionados con funciones regulatorias y enzimáticas. El gen *marA* (asociado con

multirresistencia) y *CARB-14* (beta-lactamasa) estuvieron presentes en siete de las nueve cepas; el gen *baeR* (relacionado con resistencia a novobiocina y sales biliares), en seis cepas; y los genes *acrA* (bomba de flujo multidroga), *emrR* (regulador de bomba de flujo) y *bacA* (resistencia a bacitracina) se compartieron entre cinco cepas. Los demás genes se identificaron en menos de cuatro cepas (Figura 6).

Se observó que únicamente algunas secuencias de genes de resistencia se encuentran dispuestas en tándem. Entre ellas destacan los genes *emrY*, *emrK*, *evgA*, *evgS*, *ampC* y *acrD* en la cepa B16(1)32, así como *baeR*, *baeS*, *mdtC*, *mdtB* y *mdtA* en la cepa B26(6)6, cuyos genes presentan posiciones de inicio y término subsecuentes dentro de una misma secuencia contigua de bacteriófago (Tabla suplementaria 4).

Las cepas con mayor número de GRA en bacteriófagos inducidos con mitomicina C fueron B26(6)6, Coy 3-19 y B26(6)31, con 45, 40 y 27 GRA, respectivamente. Estos resultados sugieren que los GRA presentes en los genomas de los bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV podrían haber sido adquiridos mediante transferencia horizontal de genes (THG), contribuyendo potencialmente a la adquisición de multirresistencia (Figura 6; Tabla suplementaria 4).

La distribución de los GRA presentes en los bacteriófagos de las nueve cepas mostró una tendencia similar a la observada para los FV (Figura 5). Las cepas Coy 3-19 y B26(6)31 se encontraron entre aquellas con mayor número de GRA y menor diversidad de bacteriófagos (Figura 1). Sin embargo, cepas como Meph 15-28 y 26B-Coy 6, que presentaron un menor número de GRA (13 y 5, respectivamente), también mostraron una baja diversidad de especies de bacteriófagos. Estos resultados sugieren que la presencia de GRA podría estar vinculada con la estructura de la metacomunidad (Figura 4), en la que podrían intervenir fenómenos de competencia y exclusión.

En conjunto, la presencia de FV y GRA sugiere la existencia de bacteriófagos en las cepas de *E. coli* PGV con potencial para movilizar tanto factores de virulencia como genes de resistencia. Asimismo, la mayor carga de FV y GRA observada en cepas como B26(6)6 y Coy 3-19 sugiere que algunas cepas podrían participar en mayor proporción en procesos de transferencia horizontal de genes.

Una vez observada la presencia de FV y GRA dentro de las secuencias de bacteriófagos (Figuras 5 y 6), potencialmente asociados con distintas especies de bacteriófagos identificadas (Figura 1) y organizadas en una metacomunidad con patrón de tablero de ajedrez (Figura 4), se evaluó la presencia de secuencias génicas codificantes de proteínas de bacteriófagos, con el fin de confirmar el origen fagal de las secuencias analizadas.

Genes asociados a fagos

Se analizó la presencia de genes asociados con proteínas de bacteriófagos en los genomas de los bacteriófagos inducidos con mitomicina C en las nueve cepas de *E. coli* PGV, con la finalidad de evaluar si las secuencias recuperadas correspondían a genomas completos de bacteriófagos y no a entidades tipo plásmido. En total, se identificaron 334 genes asociados con proteínas de bacteriófagos.

Posteriormente, estos genes fueron filtrados para seleccionar únicamente aquellos con coberturas y similitudes ≥ 90 % respecto a las secuencias reportadas en la base de datos “proteinafagos” de ABRicate y que, además, estuvieran presentes en al menos dos cepas. Este filtrado se realizó con la finalidad de identificar no solo las secuencias compartidas entre distintos genomas de bacteriófagos inducidos, sino también aquellas que presentarían alta similitud con las secuencias reportadas en la base de datos y una cobertura cercana a la totalidad de dichas secuencias, descartando así fragmentos parciales. Tras el filtrado, se

obtuvieron 206 secuencias de genes asociados a proteínas de bacteriófagos compartidas entre al menos dos cepas de *E. coli* PGV.

La presencia de genes asociados a proteínas (GAP) de bacteriófagos presentes en cada cepa varió entre las nueve cepas analizadas. La distribución fue la siguiente: la cepa 26B-Coy 6 presentó 168 GAP; Coy 3-19, 157 GAP; B2-31(2)33, 149 GAP; Meph 15-28, 148 GAP; B26(2)3, 140 GAP; B26(6)31, 129 GAP; B26(6)6, 106 GAP; B16(1)32, 85 GAP; y B2-31(2)36, 52 GAP (Tabla suplementaria 4; Figura 7).

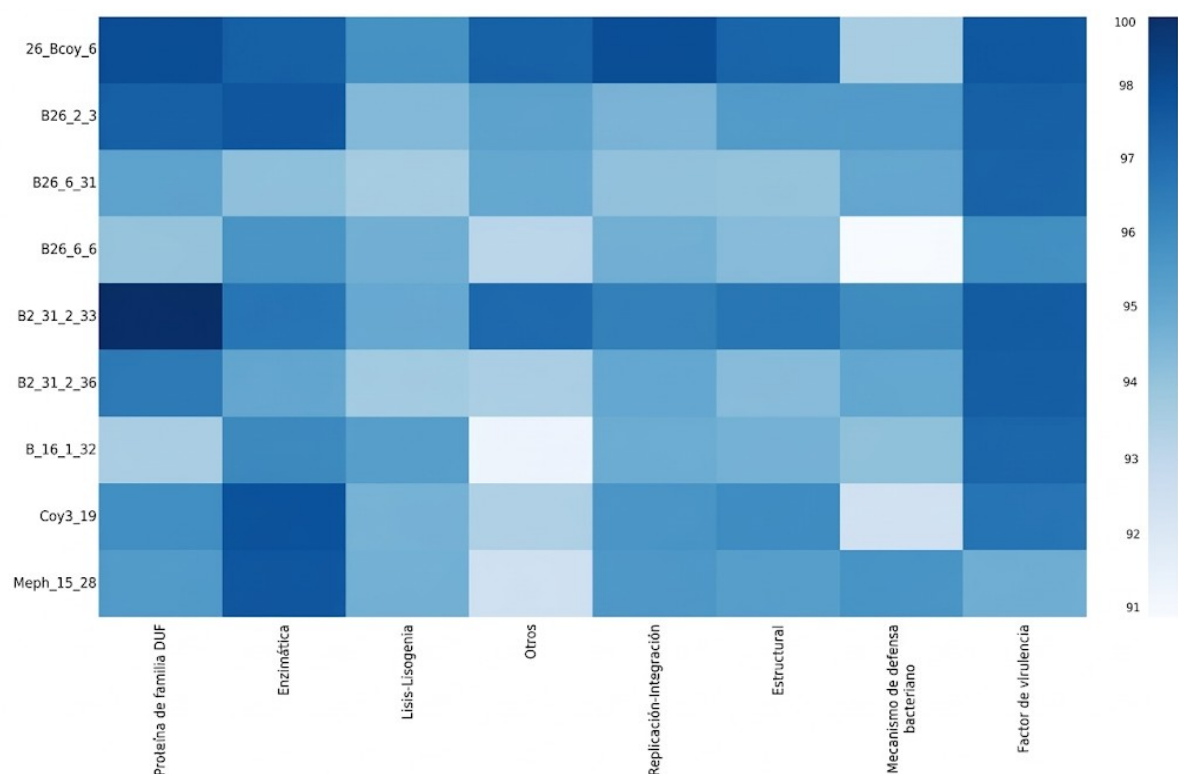


Figura 7 | Mapa de calor de la agrupación funcional de genes asociados a bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se analizó la presencia de genes asociados a funciones específicas en los bacteriófagos inducidos con mitomicina C en nueve cepas de *E. coli* PGV. La detección de dichos genes se realizó mediante ABRicate GPLv2, utilizando una base de datos curada de genes asociados a bacteriófagos (proteínafagos). Se incluyeron únicamente aquellas secuencias con coberturas y similitudes $\geq 90\%$ respecto a las secuencias reportadas en GenBank. Los genes identificados fueron agrupados funcionalmente en las siguientes categorías: procesos enzimáticos, lisis-lisogenia, replicación e integración, funciones estructurales, factores de virulencia y mecanismos de defensa bacterianos. En el eje X se representan los genes agrupados por función, mientras que en el eje Y se muestran las cepas de *E. coli* PGV donde estos se distribuyen. La barra de color indica el porcentaje de identidad respecto a las secuencias de referencia en la base de datos proteínafagos.

Además, se detectaron múltiples copias de algunos GAP dentro de una misma cepa, aunque con diferentes porcentajes de cobertura y similitud respecto a las secuencias reportadas en GenBank en los genomas de los bacteriófagos inducidos con mitomicina C. Este hallazgo podría indicar la presencia de múltiples profagos dentro de una misma cepa, es decir, un fenómeno de polilisogenia en las nueve cepas de *E. coli* PGV.

Los GAP identificados fueron clasificados según su función en las siguientes categorías: Proteínas de la familia DUF (Domain of Unknown Function); Actividad enzimática y dominios catalíticos (peptidasas, desoxinucleotidasas, reductasas, carbohidrato esterasas,

proendopeptidasas, dominios de hélice alfa, entre otros); Procesos de lisis–lisogenia (holinas, endolisinas, bacteriocinas, lisozimas, genes del cassette de lisis, represores y antirrepresores); Replicación e integración (integrasas, excisionasas, proteínas de recombinación, proteínas de replicación y reguladores transcripcionales); Funciones estructurales (proteína de la cápside mayor y menor, tallo, proteínas de cola, proteína portal, terminasa y proteínas de ensamblaje); Sistemas de defensa bacterianos (sistemas toxina–antitoxina, sistemas de restricción–modificación, sistemas regulatorios de dos componentes y dominios tipo inmunoglobulina); Factores de virulencia (FV) y genes de resistencia a antibióticos (GRA); Otros (proteínas hipotéticas o de función aún no descrita) (Figura 7).

Estas funciones estuvieron presentes en la mayoría de las secuencias de bacteriófagos inducidos en las nueve cepas de *E. coli* PGV, con excepción de la cepa B26(6)6, la cual careció de secuencias asociadas a sistemas inmunes bacterianos. Además, las secuencias identificadas mostraron coberturas y similitudes ≥ 90 % con respecto a las secuencias reportadas en la base de datos, lo que indica que no corresponden a fragmentos génicos detectados, sino a secuencias de genes con alta integridad.

En conjunto, estos resultados sugieren la posible presencia de bacteriófagos con genomas completos y funcionales en las nueve cepas de *E. coli* PGV. Asimismo, apoyan la hipótesis de que estos bacteriófagos podrían participar en la transferencia horizontal de genes (THG), contribuyendo al intercambio de material genético entre cepas y favoreciendo la generación de variación genética y nuevas variantes de *E. coli* PGV. De igual manera, la presencia de sistemas de defensa bacterianos dentro de los genomas de los bacteriófagos, así como su posible movilización, podría explicar la estructura de metacomunidad tipo tablero de ajedrez, al proporcionar a las distintas cepas mecanismos de defensa contra la infección por nuevos bacteriófagos, generando patrones de exclusión y competencia (Figura 7).

Presencia de bacteriófagos en las cepas de *E. coli* PGV

Una vez observada la presencia de GAP en los sobrenadantes de los bacteriófagos inducidos, se analizó si las secuencias identificadas correspondían realmente a un único genoma de bacteriófago o si, por el contrario, representaban secuencias asociadas a múltiples bacteriófagos inducidos en las cepas de *E. coli* PGV. Este análisis se realizó también con la finalidad de descartar que dichas secuencias correspondieran a entidades tipo bacteriófagos, en lugar de genomas de bacteriófagos.

Las secuencias de bacteriófagos recuperadas de las cepas inducidas con mitomicina C fueron filtradas y seleccionadas; únicamente se consideraron aquellas con nodos ensamblados mayores a 10 kpb. Posteriormente, se analizó la presencia de genes asociados a proteínas de bacteriófagos (GAPB) en cada uno de los nodos ensamblados por cepa, considerando las nueve cepas de *E. coli* PGV.

Para cada GAPB se examinó la posición de inicio y término dentro de cada nodo ensamblado, observándose que las secuencias eran subsecuentes entre sí (Tabla suplementaria 4). Una vez confirmado que las secuencias dentro de cada nodo mostraban una organización compatible con genomas completos, se determinó que en las nueve cepas de *E. coli* PGV se identificaron un total de 36 bacteriófagos (Figura 8).

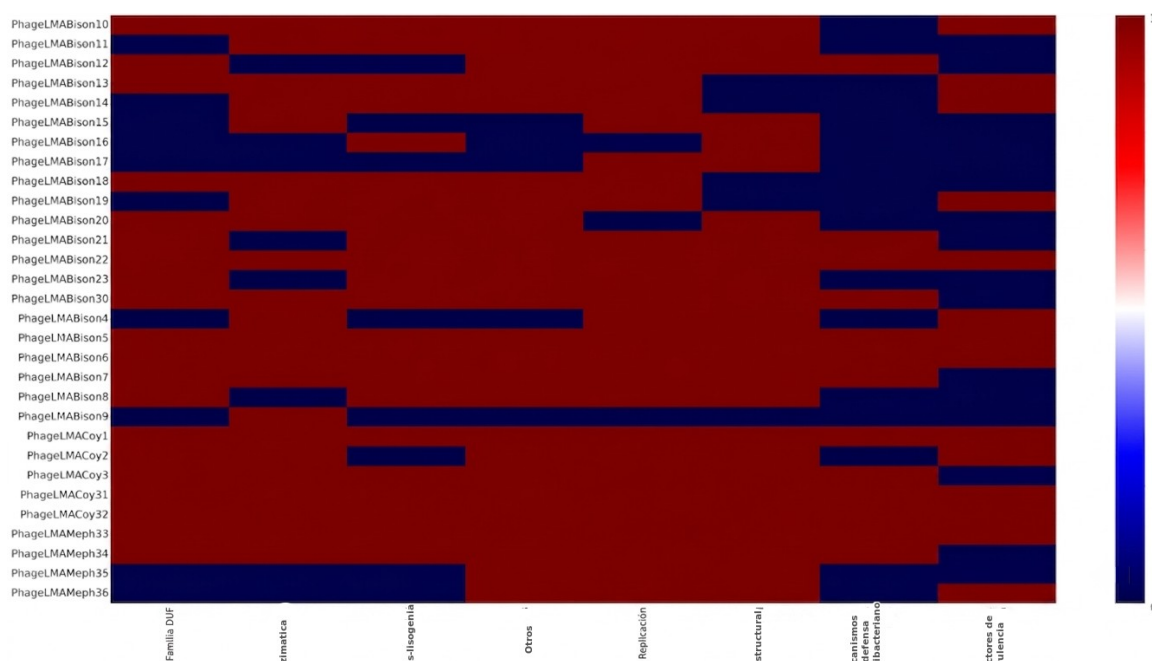


Figura 8. Mapa de calor de la agrupación funcional de genes en bacteriófagos presentes en cepas de *Escherichia coli* PGV. Se analizaron genomas completos de bacteriófagos recuperados de nueve cepas de *E. coli* PGV pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Agropecuaria (LMA), identificándose 36 bacteriófagos con genomas mayores a 10 kbp. Se evaluó la presencia de genes asociados a proteínas de bacteriófagos y estos fueron agrupados según su función biológica. La detección de genes se realizó mediante ABRicate GPLv2, utilizando una base de datos curada de genes asociados a bacteriófagos “proteinafagos”. Se consideraron únicamente aquellas secuencias con coberturas y similitudes $\geq 90\%$ respecto a las secuencias reportadas en GenBank. Los genes se clasificaron en las siguientes categorías funcionales: procesos enzimáticos, lisis-lisogenia, replicación e integración, funciones estructurales, factores de virulencia y sistemas de defensa bacterianos. En el eje X se representan los genes agrupados por función, mientras que en el eje Y se muestran los 36 bacteriófagos identificados en las distintas cepas. La escala de color indica presencia (rojo, valor = 1) o ausencia (azul, valor = 0) de los genes dentro de los grupos funcionales.

En los genomas de estos 36 bacteriófagos se detectaron genes estructurales, factores de virulencia (FV), genes asociados a los procesos de lisis-lisogenia, genes con funciones enzimáticas, proteínas implicadas en replicación e integración y, en algunos casos, genes relacionados con sistemas de defensa bacterianos (Tabla suplementaria 5; Figura 8). Los bacteriófagos fueron nombrados según la especie en la que se encontró, el número consecutivo en el orden que fueron analizados y las siglas “LMA” del Laboratorio de Microbiología Agropecuaria.

Se observó la presencia de múltiples bacteriófagos en algunas cepas: La cepa B26(6)31 presentó diez bacteriófagos completos inducidos con mitomicina C.; La cepa Meph 15-28 presentó cuatro bacteriófagos completos; Las cepas 26B-Coy 6 y B16(1)32 presentaron tres bacteriófagos completos cada una; Las cepas Coy 3-19, B26(2)3 y B26(6)6 presentaron dos bacteriófagos completos cada una; Las cepas B2-31(2)33 y B2-31(2)36 presentaron un fago completo cada una (Figura 8).

Los GAPF fueron clasificados según su función en las siguientes categorías: proteínas de la familia DUF (dominios de función desconocida), actividad enzimática y dominios catalíticos, procesos de lisis-lisogenia, replicación e integración, funciones estructurales, mecanismos de defensa bacterianos, factores de virulencia y otras funciones no caracterizadas (Figura 8).

Se observó que los 36 bacteriófagos identificados contienen GAPF asociados a funciones de lisis-lisogenia, estructurales, replicación y procesos enzimáticos. Sin embargo, los genes relacionados con virulencia (FV) o con mecanismos de defensa bacterianos estuvieron

presentes únicamente en 14 de los 36 bacteriófagos (Figura 8).

Estos resultados sugieren dos posibles escenarios: (1) la existencia de polilisogenia en algunas cepas de *E. coli* PGV, o (2) la presencia de subpoblaciones bacterianas dentro de una misma cepa que albergan distintos bacteriófagos, contribuyendo a la diversidad genómica intra-cepa. Asimismo, algunos de estos bacteriófagos podrían participar activamente en la transferencia horizontal de genes (THG), movilizandofactores de virulencia y elementos asociados a la inmunidad bacteriana entre cepas.

En estos bacteriófagos se observa la presencia de shigatoxinas provenientes de cuatro de las nueve cepas, lo que indica la posibilidad de que estas toxinas se movilizan mediante transferencia horizontal de genes (THG) mediada por bacteriófagos en las cepas de *E. coli* PGV, principalmente las variantes *stx2A* y *stx2B* (Figura 9).

Algunos bacteriófagos, como PhageLMABison9 y PhageLMABison20, presentan más de un factor de virulencia (FV) en su genoma. Asimismo, los bacteriófagos inducidos con mitomicina C en la cepa Meph 15-28 (PhageLMA35 y PhageLMA36) poseen distintos genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos (GRA) en sus genomas, lo que sugiere que se trata de bacteriófagos diferentes y podría apoyar la idea de la existencia de un evento de polilisogenia en esta cepa (Figura 9).

Estos resultados refuerzan la posibilidad de polilisogenia en las cepas de *E. coli* PGV. Además, cada bacteriófago aporta distintos FV y GRA, lo que podría favorecer la variación genética de *E. coli* PGV recuperadas de un mismo individuo dentro de una misma región geográfica (Figura 9).

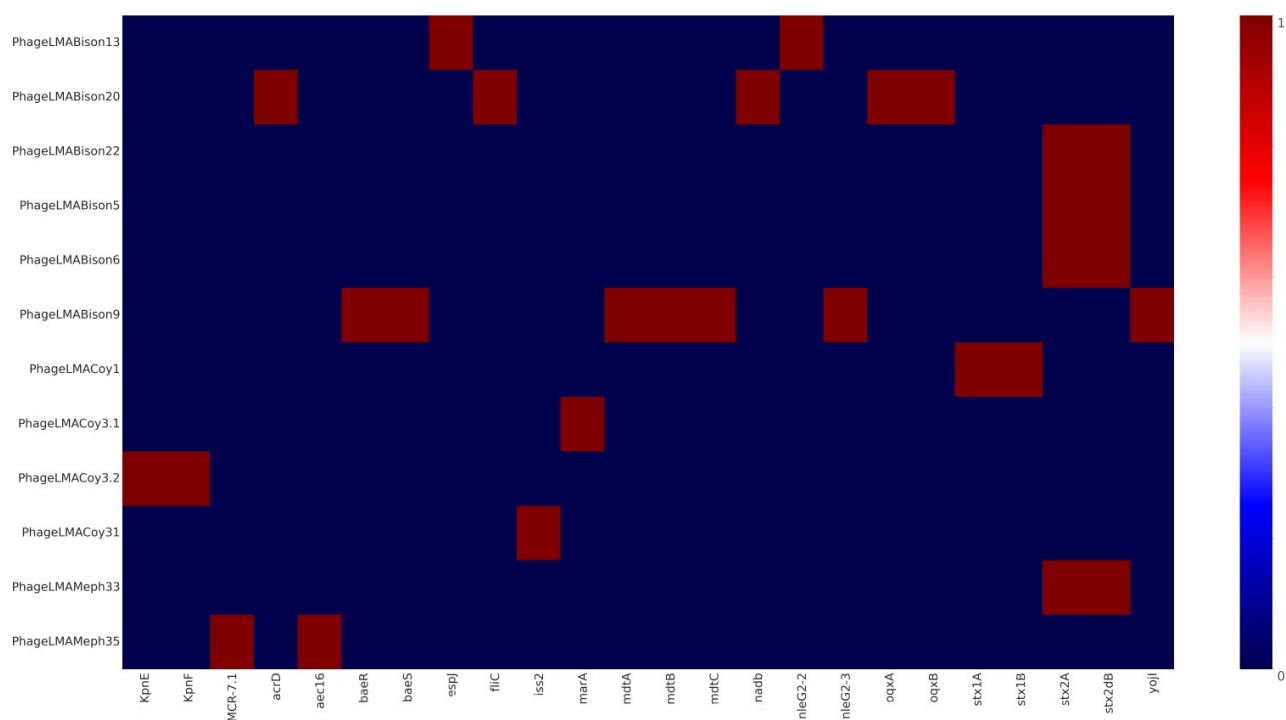


Figura 9. Mapa de calor de factores de virulencia (FV) y genes relacionados con resistencia a antimicrobianos (GRA) en bacteriófagos de cepas de *Escherichia coli* PGV del LMA. Se construyó un mapa de calor que integra la presencia de factores de virulencia (FV) y genes relacionados con resistencia a antimicrobianos (GRA) identificados en los genomas de bacteriófagos provenientes de cepas de *E. coli* PGV del Laboratorio de Microbiología Agropecuaria (LMA). El análisis se realizó sin aplicar umbrales de cobertura o similitud, considerando únicamente la coincidencia con secuencias reportadas en GenBank. La detección de genes se basó en la base de datos proteinafagos. En el eje X se representan los FV y GRA identificados,

mientras que en el eje Y se muestran los bacteriófagos en los que fueron detectados. La escala de color indica presencia (rojo, valor = 1) o ausencia (azul, valor = 0) de los FV presentes en los bacteriófagos LMA.

Una vez observada la presencia de múltiples bacteriófagos dentro de los genomas de *E. coli* PGV, así como la presencia de GRA y FV, se realizó un análisis filogenético con la finalidad de evaluar la posible relación filogenética entre los bacteriófagos inducidos con mitomicina C en las distintas cepas de *E. coli* PGV y explorar su posible participación en la transferencia horizontal de genes (THG). Para ello, se seleccionó un factor de virulencia (FV) y un gen estructural, correspondientes a los genes *stx2* y *tail*, respectivamente.

Se observó que el gen *stx2*, presente en los bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV, presenta variaciones genéticas con respecto a la cepa clásica de *E. coli* O157 Sakai y a los bacteriófagos *Stx2-converting phage Stx2a WGPS8* y *Stx2-converting phage Stx2a WGPB5* (Figura 10). Sin embargo, las secuencias del gen *stx2* identificadas en los bacteriófagos de este estudio se agrupan filogenéticamente, pese a presentar variaciones en su secuencia, formando dos grupos principales (Figura 10). Estos resultados podrían indicar que las secuencias de *stx2* presentes en los bacteriófagos recuperados de las cepas de *E. coli* PGV presentan variaciones genéticas particulares asociadas a estas cepas.



Figura 10. Mapa filogenético de *stx2* presentes en los bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV del LMA. Se realiza un análisis filogenético de máxima verosimilitud con MEGA X a la secuencia de *stx2* encontrada en los bacteriófagos del LMA, presentes en las cepas de *E. coli* PGV. Se analiza con la secuencia de referencia del gen *stx2* de la cepa de *E. coli* O157:H7 Sakai, el bacteriofago *Stx2-converting phage stx2a WSPS8* y *Escherichia phage 28951*.

Además se observa que los bacteriófagos PhageLMABisonB26(2)1 PhageLMAMeph15(28)2, PhageLMAB16(1), PhageLMACoy2-3 y PhageLMABis(1) forman un clado monofilético (una rama común a la derecha), con una distancia de 0.009, donde la secuencia de *stx2* es similar entre ellos, lo cual podría significar que proviene de un mismo origen o comparten un ancestro en común, la similitud entre fagos aislados de diferentes fuentes (bisontes, zorrillos, coyotes) sugiere que este fago portador de la toxina está circulando activamente y se está transmitiendo horizontalmente entre diferentes poblaciones bacterianas en el ambiente estudiado (Figura 10).

Esta agrupación sugiere una evolución local del gen *stx2*, manteniendo una alta homología entre los aislados independientemente de la cepa de origen y al provenir de distintos individuos podría reforzar la idea de la diseminación mediante la transferencia horizontal de

genes.

Por otra parte, el análisis filogenético basado en la similitud del gen *tail* reveló la presencia de tres clados principales (Figura 11). El primer clado está representado por los bacteriófagos PhageLMABison30_2 y PhageLMABison4, los cuales presentan una distancia filogenética de 0.4523. Ambos fueron identificados en cepas provenientes de distintos individuos (Tabla suplementaria), lo que sugiere que comparten un ancestro común reciente y, por tanto, una alta similitud en sus secuencias.

El segundo clado está conformado por PhageLMABison30 y PhageLMACoy1, con una distancia filogenética de 0.9145. Aunque estos se agrupan dentro de la misma rama principal que el clado 1, muestran una mayor divergencia genética (Figura 11). Es relevante destacar que PhageLMABison30 y PhageLMABison30_2 provienen de la misma cepa y del mismo individuo, lo que sugiere un posible proceso de diversificación intra-hospedero (Tabla suplementaria). Por su parte, PhageLMACoy1 fue aislado de un carnívoro, lo que evidencia relaciones filogenéticas entre bacteriófagos presentes en distintos ordenes de hospedadores.

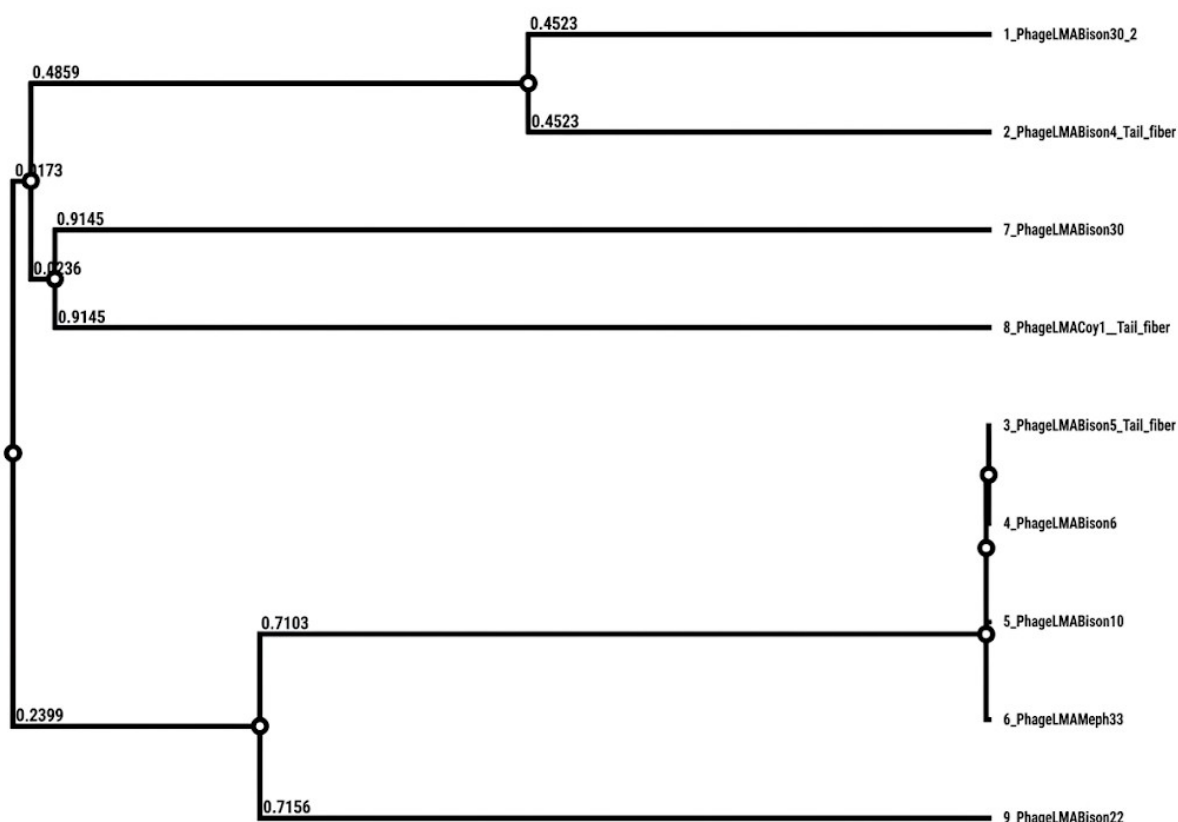


Figura 11. Mapa filogenético de *tail* presentes en los bacteriófagos de las cepas de *E. coli* PGV del LMA. Se realiza un análisis filogenético de máxima verosimilitud con MEGA X a la secuencia de *tail* encontrada en los bacteriófagos del LMA, presentes en las cepas de *E. coli* PGV.

El tercer clado incluye a los bacteriófagos PhageLMA5Bison, PhageLMABison6, PhageLMABison10, PhageLMABison22 y PhageLMAMeph33, con distancias filogenéticas cercanas a 0.7 (Figura 11). Este grupo concentra el mayor número de bacteriófagos y presenta una divergencia moderada, lo que sugiere una relativa conservación en sus secuencias. Además, estos bacteriófagos se encuentran distribuidos en distintas cepas provenientes de tres bisontes y un carnívoro, lo que podría indicar la existencia de un ancestro común compartido entre diferentes individuos y órdenes (Tabla suplementaria).

Se observa que los bacteriófagos presentes en las cepas de *E. coli* PGV provenientes de carnívoros se distribuyen en diferentes clados y presentan una relación filogenética con aquellos identificados en cepas de bisontes (Figura 11). Este resultado sugiere la transmisión de bacteriófagos entre cepas de *E. coli* de carnívoros y bisontes, lo que respaldaría la participación de los bacteriófagos en la transferencia horizontal de genes (THG) entre cepas de *E. coli* dentro de una misma región geográfica. Este fenómeno podría explicar la generación de variantes atípicas de *E. coli* PGV recuperadas de fauna silvestre.

En conjunto, los análisis filogenéticos respaldan el movimiento de FV y bacteriófagos entre distintas cepas de *E. coli* PGV de una misma región geográfica y su participación en la THG para la generación de nuevas variantes patógenas de *E. coli*.

DISCUSIÓN

Las nueve muestras secuenciadas permitieron recuperar bibliotecas con calidades $\geq Q20$ y $\geq Q30$, posterior a la secuenciación en Illumina, las cuales se consideran de buena calidad para trabajar; sin embargo, se decidió realizar una limpieza de secuencias para obtener calidades $\geq Q30$, con la finalidad de contar con secuencias de excelente calidad, con una precisión de secuenciación por base de 99.99% y una probabilidad de error de secuenciación de 1 en 1000 (Tabla suplementaria 1).

De igual forma, como se ha observado en estudios de análisis metagenómicos de la microbiota presente en distintas muestras, como la leche materna, donde se emplean lecturas pareadas resultantes de la secuenciación en la plataforma Illumina para generar ensamblajes de genomas y la detección de distintos órdenes ómicos, se asegura trabajar con calidades $\geq Q20$ y $\geq Q30$. Donde se logró, a partir de 22 muestras de leche de 11 pacientes, identificar 21 filos, 234 géneros y 487 especies, además de detectar secuencias virales (Zhang et al., 2025). Por lo tanto, las calidades Q obtenidas en la secuenciación de nuestras muestras nos permiten realizar análisis sobre la presencia de especies virales en las cepas de *E. coli* PGV.

Sin embargo, en comparación con nuestro estudio, ellos utilizaron secuencias ribosomales 16S y 18S para la búsqueda de distintas especies bacterianas. En nuestro estudio generamos un ensamblaje de *novu*, al filtrar calidades menores a Q30 nos permite generar un ensamblaje de secuencias de mejor calidad (Cuadro 1; Tabla suplementaria 1).

Así como lo comentan Liang y colaboradores (2019), las métricas $\geq Q20$ y $\geq Q30$ cumplen criterios internacionales para el análisis metagenómico. En su estudio evalúan la composición de las comunidades microbianas marinas en regiones oligotróficas, para lo cual realizan la recolección de muestras en diferentes estaciones del año en el Pacífico Occidental, con la finalidad de evaluar las comunidades microbianas a partir de análisis metagenómicos. Consecuentemente, realizan la selección de secuencias $\geq Q20$ y $\geq Q30$ para trabajar y llevar a cabo la descripción taxonómica de los organismos.

A diferencia de nuestro estudio, las muestras trabajadas en la secuenciación no provienen de ambientes complejos, sino que son procedentes de nueve sobrenadantes de inducción con mitomicina de nueve cepas de *E. coli* PGV. Por lo cual, las variaciones taxonómicas que se pueden encontrar son menores en comparación con ambientes tan complejos como los ambientes marinos.

Una vez procesadas las muestras para la eliminación de secuencias con calidades inferiores a Q30, aceptando los demás parámetros de calidad como N50 y L50, en cuatro estudios no se eliminaron todas las deduplicaciones (Tabla suplementaria 1). Esto se debe a que la presencia de duplicaciones en muestras de genomas no complejos obtenidos mediante secuenciación de *novu* podría considerarse real y no un artefacto resultante de la secuenciación (Niu et al., 2010).

Así como lo muestran Zhang y colaboradores (2023), quienes evalúan el efecto de la eliminación de duplicaciones en el análisis metagenómico de muestras de distintos orígenes, donde observan que la presencia de duplicaciones en el ensamblaje de distintos genomas podría generar sesgos. Se observa que, en genomas complejos, como agua de superficie marina, sedimentos marinos y suelos forestales —donde se considera que las muestras genéticas tienen una alta complejidad microbiana—, en comparación con lodos de biorreactor —donde la complejidad microbiana es baja—, la presencia de deduplicaciones no genera cambios significativos ($p > 0.05$), especialmente al emplear ensambladores como metaSPAdes, conocido por generar ensamblajes más largos y de mayor calidad.

Adicionalmente, consideramos que en nuestro estudio la presencia de duplicaciones de hasta el 18.48% (Tabla suplementaria 1) podría ser real y no genera incertidumbre en el ensamblaje de genomas de bacteriófagos, al considerar que el genoma de los bacteriófagos procede de cepas de *E. coli* PGV inducidas con mitomicina C, y no de ambientes complejos.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es no haber realizado la secuenciación de la bacteria, lo que habría permitido contemplar el genoma completo y la cantidad real de secuencias relacionadas a profagos. Sin embargo, el objetivo es conocer los genomas que se pueden inducir con mitomicina C a partir de estas cepas de *E. coli* PGV.

Una vez ensamblados los genomas, aceptando los parámetros de calidad, se lograron identificar 49 especies de bacteriófagos, donde el orden más abundante es el de los Caudoviricetes (anteriormente Caudovirales) (Figura suplementaria 1). Este orden se considera el grupo de bacteriófagos más abundante en distintos ecosistemas, como el intestino de niños, superficies y aguas marinas (Taboa et al., 2021; Gong et al., 2018; El Mouzan et al., 2023).

Las familias detectadas con mayor abundancia fueron Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae, respectivamente (Figura 2 suplementaria). Asimismo, en distintos estudios donde se analiza la abundancia de bacteriófagos, estas tres familias son las más predominantes (Taboa et al., 2021; Gong et al., 2018; El Mouzan et al., 2023).

Un ejemplo de esto ocurre en la bahía Prydz Bay, ubicada en la Antártida, en el sector del Océano Índico del Océano Austral, donde realizaron un estudio de la estructura y diversidad de las comunidades virales en el mar profundo mediante análisis metagenómicos, con la intención de relacionar las comunidades virales con factores ambientales. En este estudio observaron que los genomas virales en aguas superficiales pertenecían principalmente a Caudoviricetes, representando entre el 67.67% y el 71.99%, entre los cuales se encontraban Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae (Gong et al., 2018).

En el caso de aguas profundas, observaron que la composición viral estaba representada por virus gigantes, entre los que destacan Phycodnaviridae, Mimiviridae y Pandoraviridae. Además, analizaron su relación con posibles células hospedadoras, así como la presencia de elementos que funcionan como sustratos energéticos, particularmente $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{SiO}_3\text{-Si}$ y $\text{NO}_3\text{-N}$, los cuales juegan un papel importante en la estructuración de las comunidades virales (Gong et al., 2018).

En cuanto a las interacciones ecológicas de los bacteriófagos en el intestino humano, se ha observado que la inducción de estos virus es resultado de la combinación de señales bioquímicas ambientales, interacciones bacterianas y señales directas del hospedero, tales como los productos de la lisis celular. Estos fenómenos fueron evaluados en 252 aislados bacterianos del tracto digestivo humano, que incluyen 50 *Actinomycetota*, 1 *Fusobacteriota*, 51 *Bacillota*, 57 *Pseudomonadota* y 93 *Bacteroidota*. Tras la secuenciación para identificar posibles bacteriófagos inducibles, se observó que el 94 % de los aislados presentaban secuencias de profagos pertenecientes al orden *Caudoviricetes*, de los cuales se identificaron 736 bacteriófagos intactos de alta calidad con potencial de inducción. No

obstante, solo el 18 % de los bacteriófagos predichos se indujeron efectivamente. Asimismo, la inducción varió según las condiciones experimentales: cultivo puro (con mitomicina C), cocultivo, presencia de células intestinales humanas (línea Caco-2) y exposición a desechos de lisis celular, mostrando diferencias tanto en el número como en las especies de bacteriófagos inducidos. Sumado a esto, se observó que las cepas con polilisogenia promueven la inducción de múltiples bacteriófagos dentro de una misma célula, lo que resalta la compleja dinámica ecológica de estos virus a nivel intestinal (Dahlman et al., 2025).

En concordancia con múltiples reportes, el orden y la familia más abundantes en nuestro estudio fueron Caudovirales y Siphoviridae, respectivamente. No obstante, esta predominancia podría estar influenciada por el sesgo en las bases de datos, donde existen más genomas reportados para Caudovirales y para las familias Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae (Dion et al., 2020).

Asimismo, se identificó un grupo de bacteriófagos no clasificados, lo que sugiere la necesidad de realizar búsquedas más exhaustivas y de emplear múltiples enfoques metodológicos para su adecuada caracterización (Figura suplementaria 2). En nuestro estudio, únicamente se identificó el orden Caudovirales, lo cual podría estar asociado con el tipo de genomas analizados. Debido a que los genomas virales fueron recuperados mediante inducción con mitomicina C a partir de cepas aisladas, es probable que correspondan a genomas más simples y menos complejos en comparación con aquellos obtenidos de ambientes como aguas marinas, donde coexisten múltiples microorganismos portadores de bacteriófagos.

De igual forma, encontrar una mayor abundancia de familias de bacteriófagos como Siphoviridae, Podoviridae y Myoviridae no resulta inesperado. Sin embargo, se observaron porcentajes de secuencias no asignadas a ninguna familia, lo cual puede deberse a la base de datos con la que fueron comparadas nuestras muestras, así como a la presencia de secuencias pequeñas que podrían no ser reconocidas.

Cabe destacar que, desde 2023, existe una reclasificación de las familias de bacteriófagos pertenecientes al antiguo orden Caudovirales, actualmente denominado Caudoviricetes, en la cual se reorganizan las familias considerando características genéticas y no únicamente morfológicas (Zhu et al., 2022).

Una limitante de nuestro estudio es que las bases de datos no cuentan con una actualización completa de todas las especies de virus con sus respectivos órdenes y familias.

En nuestro estudio identificamos un total de 49 especies de bacteriófagos dentro de las nueve cepas de *E. coli* PGV, distribuidos en siete familias; sin embargo, existe una proporción de secuencias genómicas de bacteriófagos que son asignadas a especies, pero dichas especies no están clasificadas dentro de una familia, lo cual está relacionado con la base de datos utilizada (Figura 1; Tabla suplementaria 2).

Asimismo, la abundancia de las 49 especies de bacteriófagos detectadas en este estudio podría estar influenciada por el agente inductor utilizado (mitomicina C). Esto es relevante si se considera lo observado en el capítulo 2, donde se demostró que la presencia de líquido ruminal, en distintas concentraciones, es capaz de inducir la liberación de bacteriófagos de manera diferencial. Diversos estudios han demostrado que la abundancia y diversidad de bacteriófagos en diferentes muestras —incluyendo lodos residuales, cepas bacterianas y ambientes intestinales— pueden variar dependiendo del inductor, la concentración del mismo y las condiciones del medio al que son expuestas las bacterias (Boling et al., 2020; Miller-Ensminger et al., 2020; Ngoma et al., 2023; Zhang et al., 2025).

En nuestro estudio, uno de los géneros presentes de bacteriófagos es el de los *Lambdavirus* (Figura 1; Tabla suplementaria 2), también llamados lambdoides, dentro del cual se encuentra el fago Lambda, uno de los bacteriófagos más estudiados. Uno de los mecanismos conocidos para la inducción de los profagos *Lambda* al ciclo lítico es mediante señales SOS de reparación del ADN (Lewis, 2024). Algunos inductores actúan sobre el sistema SOS de reparación del ADN, lo que genera una respuesta dependiente de RecA que inicia la lisis y la liberación de los fagos; sin embargo, también existen mecanismos independientes del sistema RecA (Hu et al., 2023). Esto sugiere la posibilidad de que uno de los mecanismos de inducción de los bacteriófagos en nuestro estudio sea mediante la vía SOS-RecA.

Una de las limitantes de nuestro estudio es que solo se utilizó una base de datos; en consecuencia, se recomienda generar una base de datos propia o utilizar diferentes bases de datos para clasificar y asignar los genomas a familias y especies. Sin embargo, en nuestro estudio, las 49 especies de bacteriófagos pertenecen a bacteriófagos reportados en enterobacterias (Figura 1; Tabla suplementaria 2), como *Shigella phage* Ss-VASD, portador de shigatoxinas, originalmente identificado en *Shigella sonnei* asociado a problemas diarreicos en el noreste de México (Carter et al., 2016), y el *Stx2-converting phage* 1717, perteneciente al género *Lambdavirus* o bacteriófagos lambdoides, portadores de shigatoxinas y que contribuyen a la presencia de cepas STEC (Zuppi et al., 2020).

Estas 49 asignaciones de especies de bacteriófagos corresponden a una posible biblioteca comparable con la colección BASEL (BACTERIOPHAGE SELECTION for your LABORATORY), en la cual se aislaron 68 bacteriófagos líticos capaces de infectar la cepa de *E. coli* K-12, aislados de aguas residuales, compostas y ríos. Asimismo, son capaces de infectar cepas patógenas como UPEC (UTI89, CFT073), EAEC (55989) y *S. Typhimurium* (12023s, SL1344) (Maffei et al., 2021). En nuestro caso, los bacteriófagos corresponden a aquellos presentes en las cepas de *E. coli* PGV.

Además, se observa la presencia de múltiples bacteriófagos en estas cepas, lo cual no resulta inusual. En un estudio realizado por Nakamura y colaboradores (2021), se observó que cepas STEC y EPEC pueden albergar en su genoma de 10 hasta 21 profagos, muchos de estos con factores de virulencia como el sistema de secreción tipo III, clave para su patogenicidad. Sin embargo, también se observa que algunos profagos pueden integrar su material genético dentro de otros profagos ya existentes, y no únicamente en sitios de integración bacterianos.

Centrando en el estudio de la cepa STEC O145:H28, se observó la presencia de un bacteriófago residente denominado PP-ompW, el cual está integrado en el sitio *ompW* del cromosoma bacteriano; sin embargo, dentro del genoma de este profago existe una secuencia *attB* derivada de la bacteria hospedera, donde se encuentra integrado un profago portador de la shigatoxina 2a, describiéndose como una integración anidada. Al analizar otras cepas de *E. coli*, se observó que algunos profagos contienen dos o tres secuencias *attB* diferentes en su genoma.

Esta característica permite la generación de conglomerados de profagos en configuraciones complejas, incluyendo integraciones en tándem y múltiples niveles de anidamiento (Nakamura et al., 2021). Por lo tanto, la presencia de múltiples genomas de bacteriófagos como resultado de la inducción en nuestras cepas no resulta inesperada; por el contrario, una explicación biológica plausible sería la existencia de bacteriófagos anidados, donde la inducción de uno puede desencadenar la liberación de múltiples bacteriófagos.

Lamentablemente, en nuestro estudio no se analizó cómo estaban ensamblados los genomas dentro del genoma bacteriano, lo cual permitiría observar este fenómeno previamente descrito; sin embargo, una de las propuestas es continuar con el análisis de estas cepas de *E. coli*.

Tras observar variaciones en la presencia de especies de bacteriófagos entre las cepas, analizamos la diversidad y la riqueza de especies tanto por el orden del hospedero (carnívoros y bisontes) como por cada cepa de *E. coli*. Se observó que la curva de acumulación de especies, aunque no alcanza una meseta definitiva, muestra una tendencia clara a estabilizarse (Tabla 3; Figura 4 suplementaria). Esto sugiere que, al aumentar la profundidad de muestreo o el número de cepas analizadas, la detección de nuevas especies de bacteriófagos sería marginal, lo cual concuerda con lo reportado por Maffei y colaboradores (2021) y Nakamura y colaboradores (2021).

Además, la diversidad por órdenes puede variar según su origen o, como se mencionó, esta diversidad y riqueza podría depender del inductor utilizado (Figura 2). De acuerdo con Liang y colaboradores (2020), quienes analizan la diversidad y riqueza de especies mediante índices de Shannon a partir de la inducción con autoinductores como N-acil homoserina lactonas (AHLs), con el fin de evaluar la participación de mecanismos de *quorum sensing* (QS) dependientes de la densidad bacteriana en la inducción de bacteriófagos a nivel de comunidades microbianas, proponen que cada señal de QS individual podría inducir profagos en un subconjunto de bacterias y no en toda la comunidad.

Adicionalmente, observaron que la mitomicina C puede inducir una gran cantidad de bacteriófagos en una amplia gama de bacterias, en comparación con AHL, donde la diversidad observada fue menor que la inducida con mitomicina C en presencia de distintos autoinductores. Además, esto tiene un impacto directo en las comunidades bacterianas (Liang et al., 2020).

En nuestro caso, no contamos con comunidades bacterianas como tal, ya que tomamos como unidades de muestreo independientes a cada cepa (Cuadro 3; Figura 3); sin embargo, observamos que cada cepa aportaba una diversidad y riqueza de especies distinta (Cuadro 4). Para analizarlo de forma más completa, se podrían utilizar distintos inductores y evaluar los diferentes bacteriófagos inducidos por cada cepa, con la finalidad de continuar explorando esta diversidad de bacteriófagos presentes en las cepas de *E. coli* PGV.

En nuestro estudio realizamos un análisis profundo de la diversidad y la composición de la estructura de bacteriófagos, ya que el análisis de la diversidad y ecología de los bacteriófagos es fundamental para comprender su dinámica evolutiva. Por ello, se abordó la comunidad de bacteriófagos presentes en las nueve cepas mediante un enfoque ecológico de metacomunidades (Figura 4), estrategia que ha sido aplicada para entender distintas dinámicas ecológicas que permiten explicar los cambios dentro de una comunidad y los factores que la alteran (Chase et al., 2020; Leibold et al., 2004).

Este enfoque se ha utilizado para comprender cómo se modifica la composición bacteriana en microambientes o en un microbioma (Bergmann y Leveau, 2022; Miller et al., 2018), la dinámica de los virus con sus hospederos (Chow y Suttle, 2015), la interacción entre bacteriófagos y bacterias en procesos de disbiosis intestinal (Zou et al., 2019) y para explicar la dinámica e interacción entre distintos metabolitos (Danczak et al., 2020).

Desde una perspectiva ecológica, los bacteriófagos pueden participar en interacciones de depredación, simbiosis, comensalismo y mutualismo (Blazanin y Turner, 2021; Lynch et al., 2022; Olszak et al., 2017). Además, su capacidad de movilizarse entre cepas favorece procesos ecoevolutivos vinculados a respuestas a microambientes específicos (Blazanin y Turner, 2021). En este contexto, pueden presentarse fenómenos de recambio de especies, fijación y dispersión, elementos centrales en la teoría de metacomunidades (Mihaljevic, 2012; Miller et al., 2018).

Estas características permiten integrar el estudio de los bacteriófagos dentro del marco conceptual de la ecología de enfermedades y las metacomunidades (Koskella et al., 2022). En nuestro estudio, las distintas especies de bacteriófagos muestran patrones de

distribución compatibles con una metacomunidad, en la cual se observa una estructura de tablero de ajedrez o “*checkerboard*”, caracterizada por especies con patrones de distribución interespaciados y relaciones mutuamente excluyentes (Figura 4).

Este patrón fue descrito por primera vez en estudios de islas, donde estas son incapaces de soportar múltiples poblaciones de especies similares y presentan competencias mutuamente excluyentes entre las especies que conforman la metacomunidad (Presley et al., 2019).

Además, este efecto de exclusión mutua ha sido estudiado en bacteriófagos. Investigadores como Quigley y colaboradores (2028) proponen la presencia del “efecto prioridad” en la dinámica de bacteriófagos, demostrando que cuando existe competencia por interferencia entre genotipos durante una infección, el genotipo raro disminuye su probabilidad de éxito de infectar, mientras que el genotipo común aumenta su frecuencia en la población bacteriana, lo que le permite mantenerse.

Para ello, se enfrentan bacteriófagos que no presentan interferencia, lo que les permite invadir a su célula hospedadora; sin embargo, cuando se confrontan bacteriófagos que muestran interferencia entre sí, disminuye su tasa de éxito, donde la presencia o infección previa por algún bacteriófago limita la infección de otros. Se argumenta que esta misma interferencia puede promover la coexistencia a nivel de metapoblación si existen parches donde diferentes genotipos son comunes.

En nuestro caso, las distintas cepas que representan unidades de muestreo independientes podrían comportarse como pequeñas islas con diferentes parches y especies de bacteriófagos distintas (Figura 4). Al analizar su estructura, podríamos tener una representación de una metacomunidad con estructura de tablero de ajedrez.

Asimismo, la presencia de especies de bacteriófagos compartidas entre cepas podría sugerir el flujo de bacteriófagos entre distintas cepas, donde estos podrían movilizarse por bloques, y donde la presencia de algunos bacteriófagos limite la presencia de otras especies. La presencia de bacteriófagos en común entre cepas pertenecientes a distintos órdenes hospedadores sugiere que han estado en contacto con las mismas especies de bacteriófagos, lo que indica un posible flujo de bacteriófagos entre cepas de *E. coli* de bisontes y carnívoros en una misma región geográfica (Janos, Chihuahua).

En este estudio no se realizaron aislamientos de bacteriófagos para generar análisis adicionales que permitan comprobar que tienen el mismo origen; por lo cual, se sugiere analizar el genoma de las bacterias y de los bacteriófagos aislados de las cepas, realizar análisis filogenéticos para comprobar si comparten un mismo origen, además de llevar a cabo co-cultivos para evaluar esta competencia entre distintas especies de bacteriófagos.

Una posible explicación biológica de esta interferencia podría estar en mecanismos de regulación, como ocurre en el bacteriófago Lambda, donde la proteína represora CI producida por el profago integrado tiene la capacidad de bloquear otros bacteriófagos, silenciando genes y limitando su capacidad de integrarse o replicarse. Esto debido, a que el sistema Rex presente en el bacteriófago T4 genera una despolarización de la membrana una vez que ha infectado la célula hospedadora, evitando que otro bacteriófago pueda unirse a un receptor de membrana e infectarla (Wong et al., 2021).

También existen sistemas de defensa contra infecciones por bacteriófagos que pueden ser movilizados por los mismos bacteriófagos, confiriendo resistencia a futuras infecciones (Fogg et al., 2010).

Una vez observado que el sistema se comporta como una metacomunidad, donde pueden existir interacciones entre los bacteriófagos, lo cual podría darnos una explicación plausible de por qué algunos bacteriófagos presentan distintas combinaciones de FV, así como el

movimiento potencial y la posible competencia entre bacteriófagos que podrían favorecer la transferencia horizontal de genes (THG), incluyendo FV y GRA, contribuyendo a la generación de variantes patógenas y a la evolución de la patogenicidad de cepas de *E. coli* PGV provenientes de fauna silvestre de una misma región geográfica, como la Reserva de la Biosfera de Janos, Chihuahua, analizamos la presencia de FV y GRA en las secuencias de los bacteriófagos inducidos.

En el presente estudio se observó que los bacteriófagos inducidos portaban en sus genomas genes organizados en tándem, pertenecientes a distintos operones. Entre ellos se identificaron genes fimbriales (*fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG*, *fimH* y *fimI*), genes flagelares (*fliA*, *fliB*, *fliC*, *fliD*, *fliE*, *fliF*, *fliG*, *fliH*, *fliI*, *fliJ*, *fliK*, *fliL*, *fliM*, *fliN*, *fliO*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *fliS*, *fliT*, *fliY* y *fliZ*) y genes del operón LEE (*escC*, *escF* y *escR*) (Tabla suplementaria 3; Figura 5). Asimismo, en la secuencia de algunos de los bacteriófagos liberados se identificaron variantes de genes de las shigatoxinas, como *stx1B*, *stx2A* y *stx2dB* (Figura 5; Tabla suplementaria 3).

Estos resultados sugieren que los bacteriófagos liberados de las cepas de *E. coli* PGV podrían ser capaces de movilizar un conjunto de factores de virulencia entre cepas bacterianas, y no solo un número reducido de genes.

Diversos autores han señalado la capacidad de los bacteriófagos para movilizar factores de virulencia, particularmente toxinas y genes fimbriales (Choi et al., 2013; Yates et al., 2024). De manera complementaria, se ha reportado la presencia de secuencias de genes de shigatoxina en bacteriófagos lambdoides, los cuales pueden generar nuevas variantes de *E. coli* productoras de shigatoxina (STEC) mediante transferencia horizontal de genes (THG) (Khalil et al., 2016; Navarro-García, 2015).

De igual forma, se ha propuesto una relación entre la presencia de profagos y la de operones fimbriales en cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de casos clínicos (Ktari et al., 2025). Una limitación de este estudio es que no se comprobó que estos bacteriófagos puedan transducir por completo estas regiones a una nueva bacteria; bajo este escenario, se propone continuar investigando y evaluar si estos bacteriófagos son capaces de movilizar estos elementos a una bacteria receptora mediante transducción.

A pesar de provenir del mismo individuo, estas cepas comparten algunas especies de bacteriófagos, pero difieren en la cantidad de FV presentes en los genomas de los bacteriófagos, siendo la cepa B26(6)31 (de las tres cepas) la que presenta mayor diversidad de especies, pero una menor cantidad de FV (77) (Figura 5; Tabla suplementaria 3). Esto podría estar relacionado con lo propuesto por Presley y colaboradores (2019) para metacomunidades con patrón de distribución tipo tablero de ajedrez y por Quigley y colaboradores (2028) para el fenómeno de exclusión entre bacteriófagos, donde la presencia de determinados bacteriófagos podría evitar la infección por otros bacteriófagos portadores de FV, disminuyendo así la presencia de estos factores y, por ende, la posibilidad de una mayor patogenicidad.

Es decir, una alta diversidad de bacteriófagos podría generar una disminución en la presencia de FV; sin embargo, esto no se cumple en la cepa B26(6)6, que presenta alta diversidad y 133 FV (Figura 5; Tabla suplementaria 3). Basados en la hipótesis de exclusión, esto podría explicarse por la presencia en bloques de especies de bacteriófagos que permiten la coexistencia de otras especies, las cuales podrían favorecer el movimiento de múltiples FV.

El metaanálisis no es suficiente por sí solo para comprobar estas hipótesis, pero aporta evidencia de múltiples fenómenos, por lo que se continúa sugiriendo el análisis de las cepas y de los bacteriófagos mediante distintos enfoques. Además, la presencia de efectores del sistema de secreción tipo III dentro de los FV observados podría indicar eventos de

transducción de un profago dentro de otro profago, como lo observaron Nakamura y colaboradores (2021), principalmente en cepas STEC y EPEC.

Finalmente, aunque en nuestro estudio se proponen FV que no han sido ampliamente reportados como movilizados por bacteriófagos, su presencia en genomas fagales podría explicarse como resultado de transducción generalizada. Por lo tanto, existe la posibilidad de que varios de los bacteriófagos identificados en este estudio participen en la THG entre cepas de *E. coli* PGV, contribuyendo a la generación de variantes atípicas mediante la movilización de determinantes de virulencia.

Además, se analizó la presencia de GRA, observándose un total de 59 (Figura 6; Tabla suplementaria 4). Se identificó que los bacteriófagos inducidos con mayor cantidad de GRA correspondían a las mismas cepas que presentaban la mayor cantidad de FV: B26(6)31, B26(6)6 y Coy 3-19 (Figura 6; Tabla suplementaria 4). Esto podría reforzar la idea de que existe un grupo de bacteriófagos que participa en la movilización de distintos genes, mientras que otro grupo podría influir en la exclusión o permisividad de ciertas especies de bacteriófagos, afectando así la presencia de FV y GRA en las cepas de *E. coli*. Diversos autores han documentado la presencia de GRA en genomas de bacteriófagos (Chen et al., 2022; Pires et al., 2023; Wang et al., 2025). No obstante, no se ha discutido ampliamente la posibilidad de que los bacteriófagos puedan transferir operones completos de resistencia antimicrobiana. En este trabajo se propone que los bacteriófagos pudiesen participar en la movilización de operones completos, debido a su capacidad de empaquetar material genético dentro de la cápside, la cual está directamente relacionada con el tamaño del bacteriófago y con su mecanismo de empaquetamiento (Chaudhari et al., 2021; Kizziah et al., 2020). Además, se ha observado que bacteriófagos tipo plásmido pueden actuar como acarreadores de genes de resistencia, contribuyendo potencialmente a la virulencia (Greig et al., 2022).

En un estudio de Michniewski y colaboradores (2019), realizado en el río Ganges —un ambiente impactado por desechos domésticos, agrícolas e industriales— se detectó la presencia de 260 bacteriófagos, que representaron el 86.3% del total de lecturas virales. Adicionalmente, se identificaron bacteriófagos asociados a bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. y *Enterobacteria* spp., incluyendo fagos de *Enterobacteria* y *Salmonella*. En dicho estudio también se reportó la presencia de secuencias de GRA, proponiendo a los bacteriófagos como posibles mecanismos de diseminación de estos genes.

Se realizó la detección de genes asociados a proteínas de bacteriófagos (Tabla suplementaria 4; Figura 7), identificándose un total de 206 genes, los cuales fueron clasificados funcionalmente en categorías que incluyen proteínas estructurales, procesos de lisis-lisogenia, integración y replicación, mecanismos de defensa bacterianos y factores de virulencia. Esta organización funcional evidencia la diversidad de componentes genéticos presentes en los genomas virales detectados.

En concordancia con lo reportado por Zamani y colaboradores (2024), quienes describieron en el bacteriófago vB_MoxS-ISF9 de *Microbacterium oxydans* la presencia de genes estructurales, de empaquetamiento, regulación, replicación y sistemas de modificación dentro de un genoma de 59,254 pb, los resultados obtenidos en este estudio muestran un patrón funcional similar. Sin embargo, a diferencia de dicho estudio, en el que se analiza un genoma viral individual completamente ensamblado, en este trabajo se identificaron múltiples conjuntos de genes organizados en regiones continuas (*tándem*), lo que sugiere la presencia de distintos genomas de bacteriófagos dentro de las secuencias analizadas. Este hallazgo refuerza la asociación de las secuencias obtenidas con genomas virales y evidencia una mayor complejidad estructural en comparación con estudios basados en aislamientos individuales.

En nuestro estudio se identificaron 36 bacteriófagos considerados con genomas completos, derivados de la inducción con mitomicina C. Este número difiere de los 49 bacteriófagos detectados inicialmente. Sin embargo, esta discrepancia puede atribuirse a los criterios de selección empleados. En este trabajo se consideraron únicamente genomas mayores a 10 kpb que presentaran genes estructurales en su secuencia. El total inicial de 49 bacteriófagos podría explicarse por la presencia de genomas pequeños en las secuencias ensambladas del metagenoma. Aunque estos podrían considerarse errores de ensamblaje, se ha descrito que algunos genomas pequeños corresponden a microvirus, como *Leuconostoc phage* L5 (2.4 kb) y el bacteriófago MS2 (3.3 kb) (Dion et al., 2020; Paine et al., 2025).

Por otra parte, los 36 bacteriófagos reportados presentan genes estructurales característicos, tales como terminasa, proteína portal, proteína mayor de la cápside (N4-gp56), proteína de unión al ADN, proteína de la fibra de la cola, proteína de la cola, subunidad larga de la terminasa, proteína de decoración de la cabeza y proteínas del basoplato, entre otros. Estos genes se encuentran dentro de las secuencias ensambladas, aunque con variaciones respecto a las secuencias de referencia. En conjunto, estos resultados permiten inferir que las secuencias corresponden a genomas de bacteriófagos presentes en las nueve cepas de *E. coli* PGV que lograron ser inducidos.

Bajo este escenario, se identificó la presencia de múltiples bacteriófagos inducidos a partir de una misma cepa de *E. coli* PGV. Esto podría indicar eventos de integración bacteriófagos dentro de secuencias de profagos o la existencia de polilisogenia, lo cual favorecería la liberación de distintos bacteriófagos durante eventos de lisis (Barik y Mandal, 2020). La polilisogenia ha sido documentada en cepas de *E. coli* portadoras del fago lambda, cuya inducción está regulada por el sistema SOS dependiente de RecA, el cual estimula el corte proteolítico del represor CI (Barik y Mandal, 2020). En nuestro estudio se identificó la presencia de bacteriófagos lambdoides, dentro del cual se encuentra el fago lambda, uno de los más estudiados. Uno de los mecanismos conocidos para la inducción de estos profagos al ciclo lítico es mediante señales SOS de reparación del ADN (Lewis, 2024). Algunos inductores actúan sobre este sistema, generando una respuesta dependiente de RecA que inicia la lisis y la liberación de los fagos; sin embargo, también se han descrito mecanismos independientes de RecA (Hu et al., 2023). Esto sugiere que uno de los posibles mecanismos de inducción en los bacteriófagos de este estudio podría estar mediado por el sistema SOS-RecA.

Este sistema puede activarse en respuesta a estrés o daño en el ADN, así como durante eventos de estrés metabólico asociados a la formación de biopelículas. Además, la polilisogenia se ha relacionado con pequeñas proteínas, como smORF, cuya acción es independiente del sistema SOS-RecA (Silpe et al., 2023).

Por otro lado, los 36 bacteriófagos identificados presentan en sus genomas secuencias tanto de GRA como de FV, algunos de los cuales son compartidos entre diferentes bacteriófagos. En varios casos se detectaron módulos que podrían corresponder a regiones parciales de operones de resistencia; sin embargo, en la mayoría de los bacteriófagos se identificaron múltiples GRA dentro de un mismo genoma. Entre estos se incluyen genes asociados a resistencia a betalactámicos, ciprofloxacina, bacitracina, sulfonamidas, carbenicilina, tetraciclinas y sistemas de bombas de eflujo.

Estos hallazgos sugieren que algunas cepas de *E. coli* PGV podrían tener la capacidad de liberar múltiples bacteriófagos ante un evento de inducción, ya sea por polilisogenia o por transducción entre profagos. No obstante, también es posible que existan variaciones genéticas dentro de una misma cepa y que la detección de múltiples bacteriófagos corresponda a la liberación de un mismo fago desde diferentes células de la población bacteriana, constituyendo un evento colectivo (Carter et al., 2021).

En este sentido, podría estarse asumiendo erróneamente que se trata de un evento homogéneo en todas las células, cuando en realidad podría tratarse de un fenómeno poblacional en el que cada célula responde de manera distinta. Por ello, se sugiere desarrollar estrategias experimentales que permitan discriminar entre un fenómeno a nivel poblacional o celular.

Finalmente, los 36 bacteriófagos identificados podrían estar participando en la transferencia horizontal de genes (THG) de FV y GRA entre cepas de *E. coli* PGV provenientes de fauna silvestre de una misma región. Considerando que el análisis filogenético de los genes *tail* y *stx2* muestra que los bacteriófagos presentes en estas cepas tiene un mismo origen filogenético y dado que se trata de una zona donde coexisten múltiples especies animales, es plausible que se generen interacciones complejas que favorezcan los patrones de distribución observados. Aunado a esto, la posible transmisión de cepas entre fauna silvestre, fauna doméstica y humanos (Tarr et al., 2025) resalta la importancia de continuar investigando los procesos que influyen en la dinámica evolutiva de enterobacterias con relevancia en salud pública.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que los bacteriófagos presentes en las cepas de *E. coli* PGV exhiben una dinámica ecológica estructurada, caracterizada por fenómenos de exclusión y competencia, y actúan como reservorios de factores de virulencia (FV) y genes de resistencia a antimicrobianos (GRA), organizados en bloques génicos dentro de sus genomas. Esta interacción compleja, que permite la coexistencia y liberación masiva de múltiples fagos, no solo facilita la emergencia de variantes patogénicas que divergen de los patotipos clásicos, sino que también sustenta procesos de ecoevolución donde la transferencia horizontal de genes (THG) trasciende las barreras de orden entre hospedadores de una misma región geográfica. En conjunto, estos hallazgos posicionan a los bacteriófagos como agentes clave en la diversificación bacteriana de la fauna silvestre, subrayando su relevancia crítica en la salud pública y ambiental al actuar como motores de plasticidad genómica en la interfaz ecológica.

Referencias bibliográficas

- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aworh, M. K., Lawal, O. U., Egyir, B., y Hendriksen, R. S. (2025). In silico genomic insights into bacteriophages infecting ESBL-producing *Escherichia coli* from human, animal, and environmental sources. *BMC microbiology*, 25(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03913-9>
- Barik, S., y Mandal, N. C. (2020). Altered growth and envelope properties of polylysogens containing bacteriophage lambda N–CI– prophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1667. <https://doi.org/10.3390/ijms21051667>
- Bergmann, G. E., y Leveau, J. H. J. (2022). A metacommunity ecology approach to understanding microbial community assembly in developing plant seeds. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.877519>
- Bernabeu, M., Cabello-Yeves, E., Flores, E., Samarra, A., Kimberley Summers, J., Marina, A., y Collado, M. C. (2024). Role of vertical and horizontal microbial transmission of antimicrobial resistance genes in early life: insights from maternal-infant dyads. *Current opinion in microbiology*, 77, 102424.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102424>

Bernheim, A., y Sorek, R. (2019). The pan-immune system of bacteria: Antiviral defence as a community resource. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 113–119. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0278-2>

Baselga, A., Orme, D., Villegier, S., De Bortoli, J., Leprieur, F., Logez, M., Martinez-Santalla, S., Martin-Devasa, R., Gomez-Rodriguez, C., y Crujeiras, R. (2025). *betapart: Partitioning Beta Diversity into Turnover and Nestedness Components* (Version 1.6.1) [Computer software]. <https://CRAN.R-project.org/package=betapart>

Blazanin, M., y Turner, P. E. (2021). Community context matters for bacteria-phage ecology and evolution. *The ISME journal*, 15(11), 3119–3128. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01012-x>

Bonanno, L., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Oswald, E., Garnier, L., Michel, V., y Auvray, F. (2015). Diversity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 Strains Examined via stx Subtypes and Insertion Sites of Stx and EspK Bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 81(11), 3712–3721. <https://doi.org/10.1128/AEM.00077-15>

Boling, L., Cuevas, D. A., Grasis, J. A., Kang, H. S., Knowles, B., Levi, K., Maughan, H., McNair, K., Rojas, M. I., Sanchez, S. E., Smurthwaite, C., y Rohwer, F. (2020). Dietary prophage inducers and antimicrobials: Toward landscaping the human gut microbiome. *Gut Microbes*, 11(4), 721–734. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1701353>

Cahill, J., y Young, R. (2019). Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Advances in virus research*, 103, 33–70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., y Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>

Carpenter, M. R., Kalburge, S. S., Borowski, J. D., Peters, M. C., Colwell, R. R., y Boyd, E. F. (2017). CRISPR-Cas and contact-dependent secretion systems present on excisable pathogenicity islands with conserved recombination modules. *Journal of Bacteriology*, 199(10). <https://doi.org/10.1128/jb.00842-16>

Carter, M. Q., Pham, A., Du, W. X., y He, X. (2021). Differential induction of Shiga toxin in environmental *Escherichia coli* O145:H28 strains carrying the same genotype as the outbreak strains. *International journal of food microbiology*, 339, 109029. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109029>

Carter, C. C., Fierer, J., Chiu, W. W., Looney, D. J., Strain, M., y Mehta, S. R. (2016). A Novel Shiga Toxin 1a-Converting Bacteriophage of *Shigella sonnei* With Close Relationship to Shiga Toxin 2-Converting Phages of *Escherichia coli*. *Open forum infectious diseases*, 3(2), ofw079. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw079>

Chase, J. M., Jeliaskov, A., Ladouceur, E., y Viana, D. S. (2020). Biodiversity conservation through the lens of metacommunity ecology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1469(1), 86–104. <https://doi.org/10.1111/nyas.14378>

Chatterjee, A., y Duerkop, B. A. (2019). Sugar and fatty acids accelerate prophage induction. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 175–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.012>

- Chaguza, C., Chibwe, I., Chaima, D., Musicha, P., Ndeketa, L., Kasambara, W., Mhango, C., Mseka, U. L., Bitilinyu-Bangoh, J., Mvula, B., Kipandula, W., Bonongwe, P., Munthali, R. J., Ngwira, S., Mwendera, C. A., Kalizang'oma, A., Jambo, K. C., Kambalame, D., Kamng'ona, A. W., Steele, A. D., Jere, K. C. (2024). Genomic insights into the 2022-2023 *Vibrio cholerae* outbreak in Malawi. *Nature communications*, 15(1), 6291. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50484-w>
- Chaudhari, H. V., Inamdar, M. M., y Kondabagil, K. (2021). Scaling relation between genome length and particle size of viruses provides insights into viral life history. *iScience*, 24(5), 102452. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102452>
- Chen, Q., Dharmaraj, T., Cai, P. C., Burgener, E. B., Haddock, N. L., Spakowitz, A. J., y Bollyky, P. L. (2022). Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics. *Pharmaceutics*, 14(7), 1425. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071425>
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., y Brüssow, H. (2004). Phage-Host interaction: An ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3677–3686. <https://doi.org/10.1128/jb.186.12.3677-3686.2004>
- Choi, Y., Shin, H., Lee, J.-H., y Ryu, S. (2013). Identification and Characterization of a Novel Flagellum-Dependent Salmonella-Infecting Bacteriophage, iEPS5. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4829–4837. <https://doi.org/10.1128/aem.00706-13>
- Chow, C.-E. T., y Suttle, C. A. (2015). Biogeography of viruses in the sea. *Annual Review of Virology*, 2(1), 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085540>
- Cornelis, G. R., Agrain, C., y Sorg, I. (2006). Length control of extended protein structures in bacteria and bacteriophages. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.002>
- Creuzburg, K., Heeren, S., Lis, C. M., Kranz, M., Hensel, M., y Schmidt, H. (2011). Genetic background and mobility of variants of the gene *nleA* in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 77(24), 8705–8713. <https://doi.org/10.1128/AEM.06492-11>
- Dallas, T. 2014. metacom: an R package for the analysis of metacommunity structure. – *Ecography* 37: 402–405. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2013.00695.x>
- Dahlman, S., Avellaneda-Franco, L., Rutten, E. L., Gulliver, E. L., Solari, S., Chonwerawong, M., Kett, C., Subedi, D., Young, R. B., Campbell, N., Gould, J. A., Bell, J. D., Docherty, C. A. H., Turkington, C. J. R., Nezam-Abadi, N., Grasis, J. A., Lyras, D., Edwards, R. A., Forster, S. C., y Barr, J. J. (2025). Isolation, engineering and ecology of temperate phages from the human gut. *Nature*, 647(8090), 698–705. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09614-7>
- Danczak, R. E., Chu, R. K., Fansler, S. J., Goldman, A. E., Graham, E. B., Tfaily, M. M., Toyoda, J., y Stegen, J. C. (2020). Using metacommunity ecology to understand environmental metabolomes. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19989-y>
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Magagnini, M., Noble, R., Tamburini, C., y Weinbauer, M. (2008). Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature*, 454(7208), 1084–1087. <https://doi.org/10.1038/nature07268>

- Dion, M. B., Oechslin, F., y Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Dixon, P. (2003). VEGAN, A Package of R Functions for Community Ecology. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 927–930. <http://www.jstor.org/stable/3236992>
- El Mouzan, M. I., Assiri, A. A., Al Sarkhy, A. A., y Alasmi, M. M. (2023). Gut virome profile in healthy Saudi children. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, 29(3), 171–176. https://doi.org/10.4103/sjg.sjg_444_22
- Elois, M. A., Silva, R. D., Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., y Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*, 15(2), 349. <https://doi.org/10.3390/v15020349>
- Emerson, J. B. (2019). Soil viruses: A new hope. *mSystems*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.00120-19>
- Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., y Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific reports*, 11(1), 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- Fillol-Salom, A., Alsaadi, A., Sousa, J. A. M. de, Zhong, L., Foster, K. R., Rocha, E. P. C., Penadés, J. R., Ingmer, H., y Haaber, J. (2019). Bacteriophages benefit from generalized transduction. *PLOS Pathogens*, 15(7), e1007888. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007888>
- Fogg, P. C., Allison, H. E., Saunders, J. R., y McCarthy, A. J. (2010). Bacteriophage lambda: a paradigm revisited. *Journal of virology*, 84(13), 6876–6879. <https://doi.org/10.1128/JVI.02177-09>
- Fuhrman, J. (2003). Viruses in the marine environment. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env244>
- Gong, Z., Liang, Y., Wang, M., Jiang, Y., Yang, Q., Xia, J., Zhou, X., You, S., Gao, C., Wang, J., He, J., Shao, H., y McMinn, A. (2018). Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay, Antarctica. *Frontiers in microbiology*, 9, 2981. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02981>
- Greig, D. R., Bird, M. T., Chattaway, M. A., Langridge, G. C., Waters, E. V., Ribeca, P., Jenkins, C., y Nair, S. (2022). Characterization of a P1-bacteriophage-like plasmid (phage-plasmid) harbouring blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microbial genomics*, 8(12), mgen000913. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000913>
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J., y Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790), 327–336. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1894-8>
- Harris, C.R., Millman, K.J., van der Walt, S.J. et al. Array programming with NumPy. *Nature* 585, 357–362 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>

- Heino, J. (2012). The importance of metacommunity ecology for environmental assessment research in the freshwater realm. *Biological Reviews*, 88(1), 166–178. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.2012.00244.x>
- Henrot, C., y Petit, M. A. (2022). Signals triggering prophage induction in the gut microbiota. *Molecular microbiology*, 118(5), 494–502. <https://doi.org/10.1111/mmi.14983>
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., y Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, 11(7), 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Hu, J., Wu, Y., Kang, L., Liu, Y., Ye, H., Wang, R., Zhao, J., Zhang, G., Li, X., Wang, J., y Han, D. (2023). Dietary D-xylose promotes intestinal health by inducing phage production in *Escherichia coli*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00445-w>
- Hunter, J. D. "Matplotlib: A 2D Graphics Environment", Computing in Science y Engineering, vol. 9, no. 3, pp. 90-95, 2007. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- Jenkins, C., Chattaway, M. A., y Ready, D. (2025). Hybrid pathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 136(10), 1xaf250. <https://doi.org/10.1093/jambio/1xaf250>
- Kindt R, Coe R (2005). Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. World Agroforestry Centre (ICRAF). ISBN 92-9059-179-X, <http://www.worldagroforestry.org/output/tree-diversity-analysis>.
- Kizziah, J. L., Rodenburg, C. M., y Dokland, T. (2020). Structure of the Capsid Size-Determining Scaffold of "Satellite" Bacteriophage P4. *Viruses*, 12(9), 953. <https://doi.org/10.3390/v12090953>
- Khalil, R. K. S., Skinner, C., Patfield, S., y He, X. (2016). Phage-mediated Shiga toxin (Stx) horizontal gene transfer and expression in non-Shiga toxigenic Enterobacter and *Escherichia coli* strains. *Pathogens and Disease*, 74(5), ftw037. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw037>
- Komeda, Y., Shimada, K., y Iino, T. (1977). Isolation of specialized lambda transducing bacteriophages for flagellar genes (fla) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Virology*, 22(3), 654–661. <https://doi.org/10.1128/jvi.22.3.654-661.1977>
- Koskella, B., Hernandez, C. A., y Wheatley, R. M. (2022). Understanding the impacts of bacteriophage viruses: From laboratory evolution to natural ecosystems. *Annual Review of Virology*, 9(1), 57–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-075914>
- Ku, H., Kelk, D., Bauer, D. C., y Sidhu, J. P. S. (2025). Phage-plasmid hybrids as vectors for antibiotic resistance in environmental *Escherichia coli*. *The Science of the total environment*, 959, 178157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178157>
- Ktari, S., Smaoui, F., Ksibi, B., Maalej, S., Rhimi, F., Le Hello, S., y Hammami, A. (2025). Genome-based assessment of antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and prophage diversity across clinical *Salmonella Typhimurium* isolates in the south of Tunisia. *Microbial pathogenesis*, 206, 107850. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107850>

- Labrie, S. J., Samson, J. E., y Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Leprince, A., y Mahillon, J. (2023). Phage Adsorption to Gram-Positive Bacteria. *Viruses*, 15(1), 196. <https://doi.org/10.3390/v15010196>
- Lynch, J. B., Bennett, B. D., Merrill, B. D., Ruby, E. G., y Hryckowian, A. J. (2022). Independent host- and bacterium-based determinants protect a model symbiosis from phage predation. *Cell reports*, 38(7), 110376. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110376>
- Leibold, M.A. y Mikkelsen, G.M. (2002), Coherence, species turnover, and boundary clumping: elements of meta-community structure. *Oikos*, 97: 237-250. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x>
- Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., y Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters*, 7(7), 601-613. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x>
- Lopez, J. A., McKeithen-Mead, S., Shi, H., Nguyen, T. H., Huang, K. C., y Good, B. H. (2025). Abundance measurements reveal the balance between lysis and lysogeny in the human gut microbiome. *Current Biology*, 35(10), 2282-2294.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.03.073>
- López-Islas, J. J., Martínez-Gómez, D., Ortiz-López, W. E., Reyes-Cruz, T., López-Pérez, A. M., Eslava, C., y Méndez-Olvera, E. T. (2024). *Escherichia coli* Strains Isolated from American Bison (*Bison bison*) Showed Uncommon Virulent Gene Patterns and Antimicrobial Multi-Resistance. *Microorganisms*, 12(7), 1367. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071367>
- López-Islas, J. J., Méndez-Olvera, E. T., Martínez-Gómez, D., López-Pérez, A. M., Orozco, L., Suzan, G., y Eslava, C. (2022)a. Characterization of *Salmonella* spp. and *E. coli* Strains Isolated from Wild Carnivores in Janos Biosphere Reserve, Mexico. *Animals*, 12(9), 1064. <https://doi.org/10.3390/ani12091064>
- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., Heyer, Y., Estermann, F., Druelle, V., Sauer, P., Willi, L., Michaelis, S., Hilbi, H., Thaler, D. S., y Harms, A. (2021). Systematic exploration of *Escherichia coli* phage-host interactions with the BASEL phage collection. *PLoS biology*, 19(11), e3001424. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001424>
- McKinney, W., y others. (2010). Data structures for statistical computing in python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* (Vol. 445, pp. 51–56). <https://doi.org/10.25080/Majors-92bf1922-00a>
- Mihaljevic, J. R. (2012). Linking metacommunity theory and symbiont evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.01.011>
- Miller, E. T., Svanbäck, R., y Bohannan, B. J. M. (2018). Microbiomes as metacommunities: Understanding host-associated microbes through metacommunity ecology. *Trends in Ecology; Evolution*, 33(12), 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.002>
- Miller-Ensminger, T., Garretto, A., Stark, N., y Putonti, C. (2020). Mimicking

prophage induction in the body: Induction in the lab with pH gradients. *PeerJ*, 8, e9718. <https://doi.org/10.7717/peerj.9718>

Michniewski, S., Redgwell, T., Grigonyte, A., Rihtman, B., Aguilo-Ferretjans, M., Christie-Oleza, J., Jameson, E., Scanlan, D. J., y Millard, A. D. (2019). Riding the wave of genomics to investigate aquatic coliphage diversity and activity. *Environmental microbiology*, 21(6), 2112–2128. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14590>

Mirzaei, M. K., y Maurice, C. F. (2017). Ménage à trois in the human gut: Interactions between host, bacteria and phages. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.30>

Nakamura, K., Ogura, Y., Gotoh, Y., y Hayashi, T. (2021). Prophages integrating into prophages: A mechanism to accumulate type III secretion effector genes and duplicate Shiga toxin-encoding prophages in *Escherichia coli*. *PLOS Pathogens*, 17(4), e1009073. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009073>

Navarro-Garcia, F. (2015). *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: An Enterohemorrhagic *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. In *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli* (pp. 503–529). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818791.ch26>

Niu, B., Fu, L., Sun, S., y Li, W. (2010). Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. *BMC bioinformatics*, 11, 187. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-187>

Ngoma, N. F. N., Malahlela, M. N., Marufu, M. C., Cenci-Goga, B. T., Grispoli, L., Etter, E., Kalake, A., y Karama, M. (2023). Antimicrobial growth promoters approved in food-producing animals in South Africa induce shiga toxin-converting bacteriophages from *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Pathogens*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00590-9>

Nobrega, F.L., Vlot, M., de Jonge, P.A. et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 16, 760–773 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., y Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>

Oladeinde, A., Cook, K., Lakin, S. M., Woyda, R., Abdo, Z., Looft, T., Herrington, K., Zock, G., Lawrence, J. P., Thomas, J. C., IV, Beaudry, M. S., y Glenn, T. (2019). Horizontal Gene Transfer and Acquired Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg following In Vitro Incubation in Broiler Ceca. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01903-19>

Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A., y Drulis-Kawa, Z. (2017). Phage life cycles behind bacterial biodiversity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(36). <https://doi.org/10.2174/0929867324666170413100136>

Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin P, O'Hara R, Solymos P, Stevens M, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, De Caceres M, Durand S, Evangelista H, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill M, Lahti L, McGlinn D, Ouellette M, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Ter Braak C, Weedon J (2024). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-6.1. <https://CRAN.R->

project.org/package=vegan

Paine, A. W., Garmann, R. F., y Manoharan, V. N. (2025). Extracellular uncoating of bacteriophage MS2. *Journal of Molecular Biology*, 169316. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169316>

Paul, J. H., Sullivan, M. B., Segall, A. M., y Rohwer, F. (2002). Marine phage genomics. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 133(4), 463–476. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(02\)00168-9](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(02)00168-9)

Pas, C., Latka, A., Fieseler, L., y Briers, Y. (2023). Phage tailspike modularity and horizontal gene transfer reveals specificity towards *E. coli* O-antigen serogroups. *Virology Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02138-4>

Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., y Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current opinion in microbiology*, 23, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>

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

Puxty, R. J., y Millard, A. D. (2023). Functional ecology of bacteriophages in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 71, 102245. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102245>

Quigley, B. J. Z., Brown, S. P., Leggett, H. C., Scanlan, P. D., y Buckling, A. (2018). Within-host interference competition can prevent invasion of rare parasites. *Parasitology*, 145(6), 770–774. <https://doi.org/10.1017/S003118201700052X>

Ray, K. (2019). Gut mucosal virome altered in ulcerative colitis. *Nature Reviews Gastroenterology; Hepatology*, 16(5), 262–262. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0141-y>

Rao V. B. (2025). Bacteriophage T4 genome packaging: mechanism and application. *EcoSal Plus*, 13(1), eesp00042025. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2025>

Rodriguez-Valera, F., Martin-Cuadrado, A. B., Rodriguez-Brito, B., Pasić, L., Thingstad, T. F., Rohwer, F., y Mira, A. (2009). Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(11), 828–836. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2235>

Salmond, G. P. C., y 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>

Seemann T, Abricate, Github <https://github.com/tseemann/abricate>, NCBI AMRFinderPlus - <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>, CARD - <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>, Resfinder - <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>, ARG-ANNOT - <https://doi.org/10.1128/aac.01310-13> VFDB - <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1239>

Shao, Q., Trinh, J. T., y Zeng, L. (2019). High-resolution studies of lysis–lysogeny decision-making in bacteriophage lambda. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10), 3343–3349. <https://doi.org/10.1074/jbc.tm118.003209>

- Silpe, J. E., Duddy, O. P., Johnson, G. E., Beggs, G. A., Hussain, F. A., Forsberg, K. J., y Bassler, B. L. (2023). Small protein modules dictate prophage fates during polylysogeny. *Nature*, 620(7974), 625–633. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06376-y>
- Taboada, B., Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Iša, P., Rojas-Velázquez, L., Pérez-Juárez, H., López, S., Torres, J., Ximenez, C., y Arias, C. F. (2021). The gut virome of healthy children during the first year of life is diverse and dynamic. *PloS one*, 16(4), e0240958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240958>
- Talavera-González, J. M., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Vázquez-Navarrete, J., y Salgado-Miranda, C. (2021). In vitro transduction of antimicrobial resistance genes into *Escherichia coli* isolates from backyard poultry in Mexico. *Canadian journal of microbiology*, 67(5), 415–425. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0280>
- Tithi, S. S., Aylward, F. O., Jensen, R. V., y Zhang, L. (2018). FastViromeExplorer: A pipeline for virus and phage identification and abundance profiling in metagenomics data. *PeerJ*, 6, e4227. <https://doi.org/10.7717/peerj.4227>
- Tokuda, M., y Shintani, M. (2024). Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microbial Biotechnology*, 17(1). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14408>
- Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I., Sakaguchi, Y., Gamoh, K., Kato, S., Daibata, M., Ujihara, T., Misawa, N., y Matsuzaki, S. (2014). Intragenus generalized transduction in *Staphylococcus* spp. by a novel giant phage. *The ISME journal*, 8(9), 1949–1952. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.29>
- Van Duyne, G. D., y Landy, A. (2024). Bacteriophage lambda site-specific recombination. *Molecular microbiology*, 121(5), 895–911. <https://doi.org/10.1111/mmi.15241>
- Volkova, V. V., Lu, Z., Besser, T., y Gröhn, Y. T. (2014). Modeling the infection dynamics of bacteriophages in enteric *Escherichia coli*: estimating the contribution of transduction to antimicrobial gene spread. *Applied and environmental microbiology*, 80(14), 4350–4362. <https://doi.org/10.1128/AEM.00446-14>
- Waltenburg, M. A., Schwensohn, C., Madad, A., Seelman, S. L., Peralta, V., Koske, S. E., Boyle, M. M., Arends, K., Patel, K., Mattioli, M., Gieraltowski, L., Neil, K. P., y Outbreak Investigation Team (2021). Two multistate outbreaks of a reoccurring Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain associated with romaine lettuce: USA, 2018–2019. *Epidemiology and infection*, 150, e16. <https://doi.org/10.1017/S0950268821002703>
- Wang, Q., Wang, M., Yang, Q., Feng, L., Zhang, H., Wang, R., y Wang, R. (2025). The role of bacteriophages in facilitating the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 268, 122776. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122776>
- Waskom, M. L., (2021). seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021, <https://doi.org/10.21105/joss.03021>
- Wickham H (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wickham, H., Girlich, M., y Ruiz, E. (2025). *dbplyr: A 'dplyr' Back End for Databases*

(R package version 2.5). <http://CRAN.R-project.org/package=dplyr>

Wong, S., Alattas, H., y Slavcev, R. A. (2021). A snapshot of the λ T4rII exclusion (Rex) phenotype in *Escherichia coli*. *Current genetics*, 67(5), 739–745. <https://doi.org/10.1007/s00294-021-01183-2>

Wolput, S., Lood, C., Fillol-Salom, A., Casters, Y., Albasiony, A., Cenens, W., Vanoirbeek, K., Kerremans, A., Lavigne, R., Penadés, J. R., y Aertsen, A. (2024). Phage-host co-evolution has led to distinct generalized transduction strategies. *Nucleic Acids Research*, 52(13), 7780–7791. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae489>

Yates, C. R., Nguyen, A., Liao, J., y Cheng, R. A. (2024). What's on a prophage: Analysis of *Salmonella* spp. prophages identifies a diverse range of cargo with multiple virulence- and metabolism-associated functions. *mSphere*, 9(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00031-24>

Zhu, Y., Shang, J., Peng, C., y Sun, Y. (2022). Phage family classification under *Caudoviricetes*: A review of current tools using the latest ICTV classification framework. *Frontiers in microbiology*, 13, 1032186. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032186>

Zhang, Q., Zhang, Y., Zhu, J., Gao, Y., Zeng, W., y Qi, H. (2025). Microbiome Profiling of Pretreated Human Breast Milk Using Shotgun Metagenomic Sequencing. *Journal of microbiology and biotechnology*, 35, e2506012. <https://doi.org/10.4014/jmb.2506.06012>

Zhang, Z., Zhang, L., Zhang, G., Zhao, Z., Wang, H., y Ju, F. (2023). Deduplication Improves Cost-Efficiency and Yields of De Novo Assembly and Binning of Shotgun Metagenomes in Microbiome Research. *Microbiology spectrum*, 11(2), e0428222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04282-22>

Zhang, Q., Jiang, P., Tan, C., Yu, J., Wang, W., y Xiao, X. (2025). Similar prophage induction but divergent antibiotic resistance gene occurrence: Leachates and free radicals drive differential activation mechanisms in aged tire crumb rubber. *Environmental Science; Technology*, 59(24), 11974–11984. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c12499>

Zolfo, M., Pinto, F., Asnicar, F., Manghi, P., Tett, A., Bushman, F. D., y Segata, N. (2019). Detecting contamination in viromes using ViromeQC. *Nature biotechnology*, 37(12), 1408–1412. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0334-5>

Zuo, T., Lu, X. J., Zhang, Y., Cheung, C. P., Lam, S., Zhang, F., Tang, W., Ching, J. Y. L., Zhao, R., Chan, P. K. S., Sung, J. J. Y., Yu, J., Chan, F. K. L., Cao, Q., Sheng, J. Q., y Ng, S. C. (2019). Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut*, 68(7), 1169–1179. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318131>

Zuppi, M., Tozzoli, R., Chiani, P., Quiros, P., Martinez-Velazquez, A., Michelacci, V., Muniesa, M., y Morabito, S. (2020). Investigation on the Evolution of Shiga Toxin-Converting Phages Based on Whole Genome Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 11, 1472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01472>

Figuras Suplementarias Capítulo 3

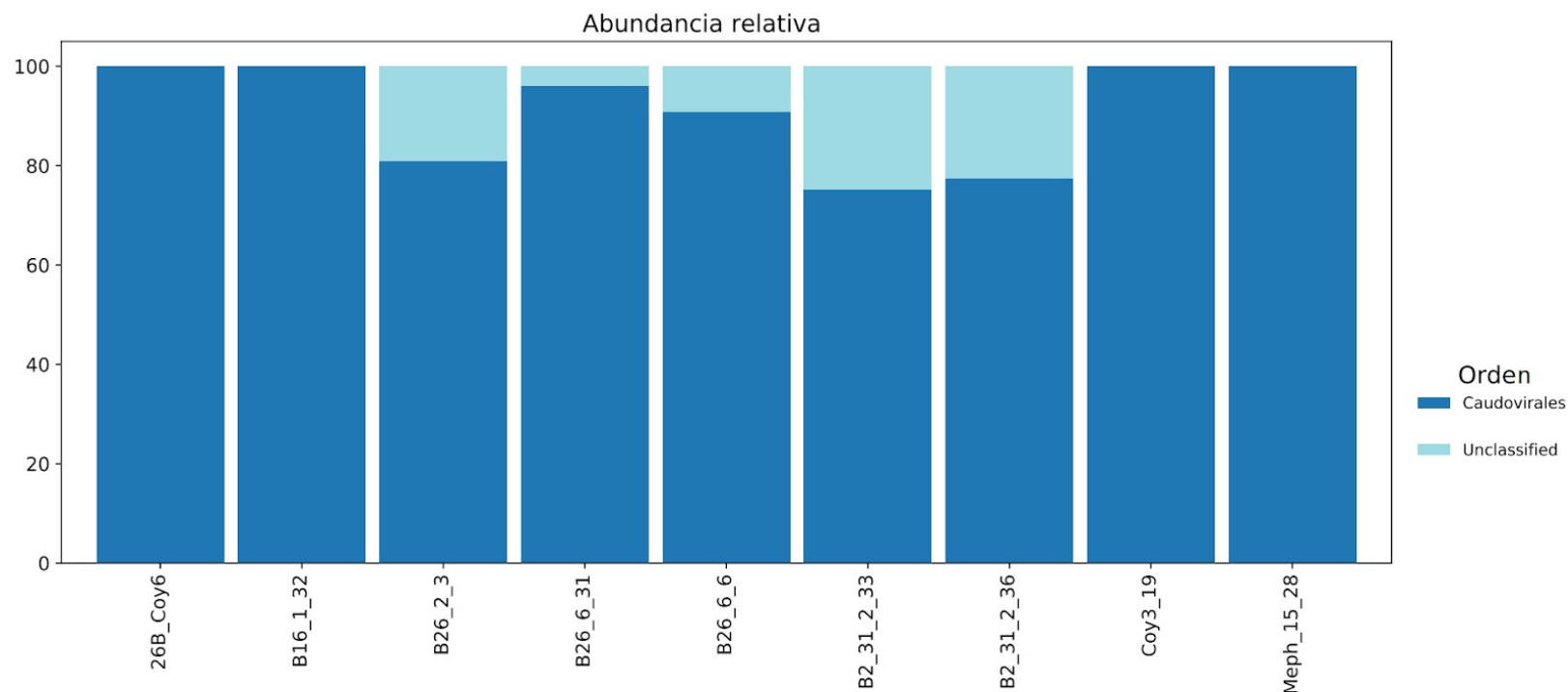


Figura suplementaria 1. Abundancia relativa de órdenes de bacteriófagos presentes en las nueve cepas de *E. coli* PGV. La presencia de los órdenes de bacteriófagos se analizó mediante FastViromeExplore, utilizando las secuencias contiguas obtenidas a partir de la secuenciación masiva del ADN viral recuperado tras la inducción con mitomicina C. Se muestran los porcentajes de abundancia relativa por orden de bacteriófago en cada una de las nueve cepas de *E. coli* PGV.

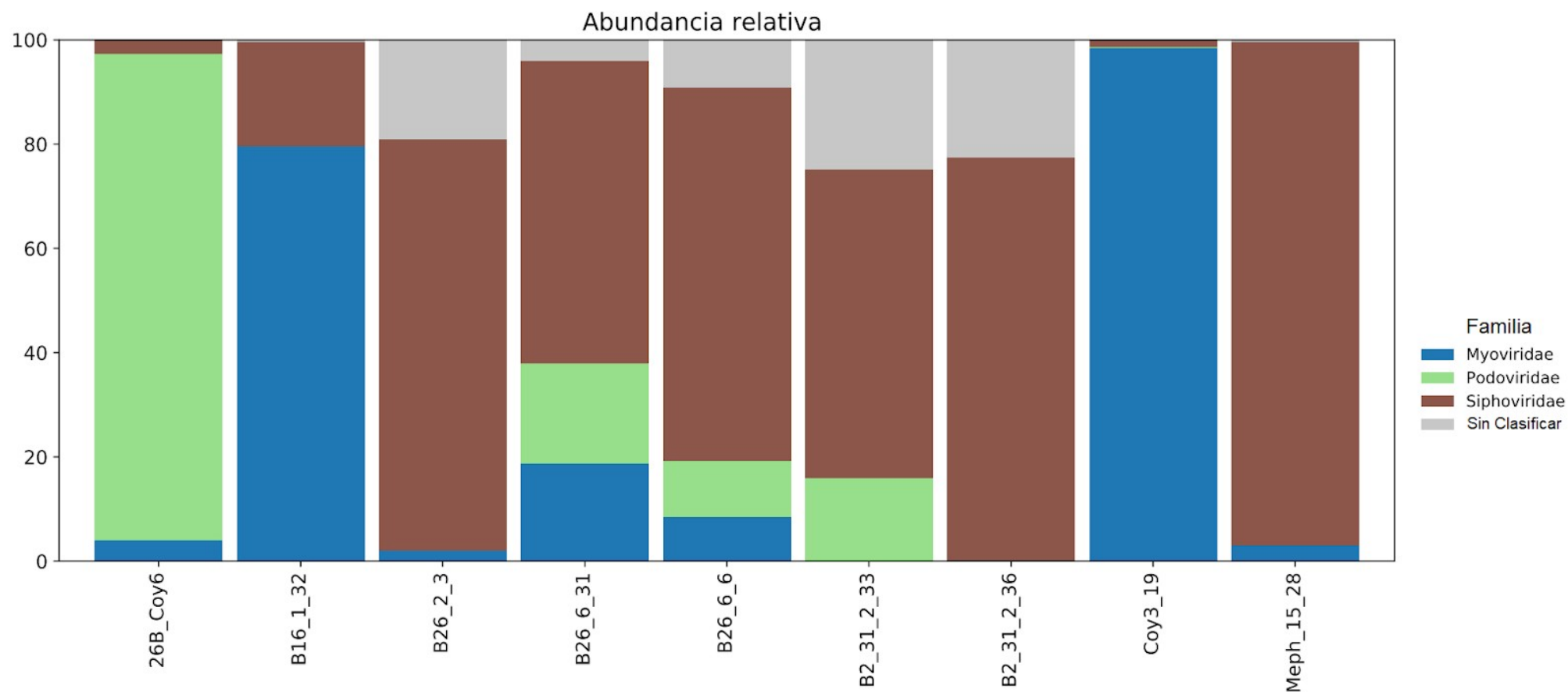


Figura Suplementaria 1. Abundancia relativa de órdenes de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se evaluó la distribución de los órdenes de bacteriófagos presentes en nueve cepas de *E. coli* PGV mediante el análisis de secuencias contiguas obtenidas a partir de la secuenciación masiva del ADN viral recuperado tras la inducción con mitomicina C. La clasificación taxonómica se realizó utilizando FastViromeExplorer v1.3, a partir de los ensamblajes generados. Se muestran los porcentajes de abundancia relativa de cada orden de bacteriófagos detectado en cada una de las nueve cepas de *E. coli* PGV, reflejando la estructura taxonómica global de las comunidades virales analizadas.

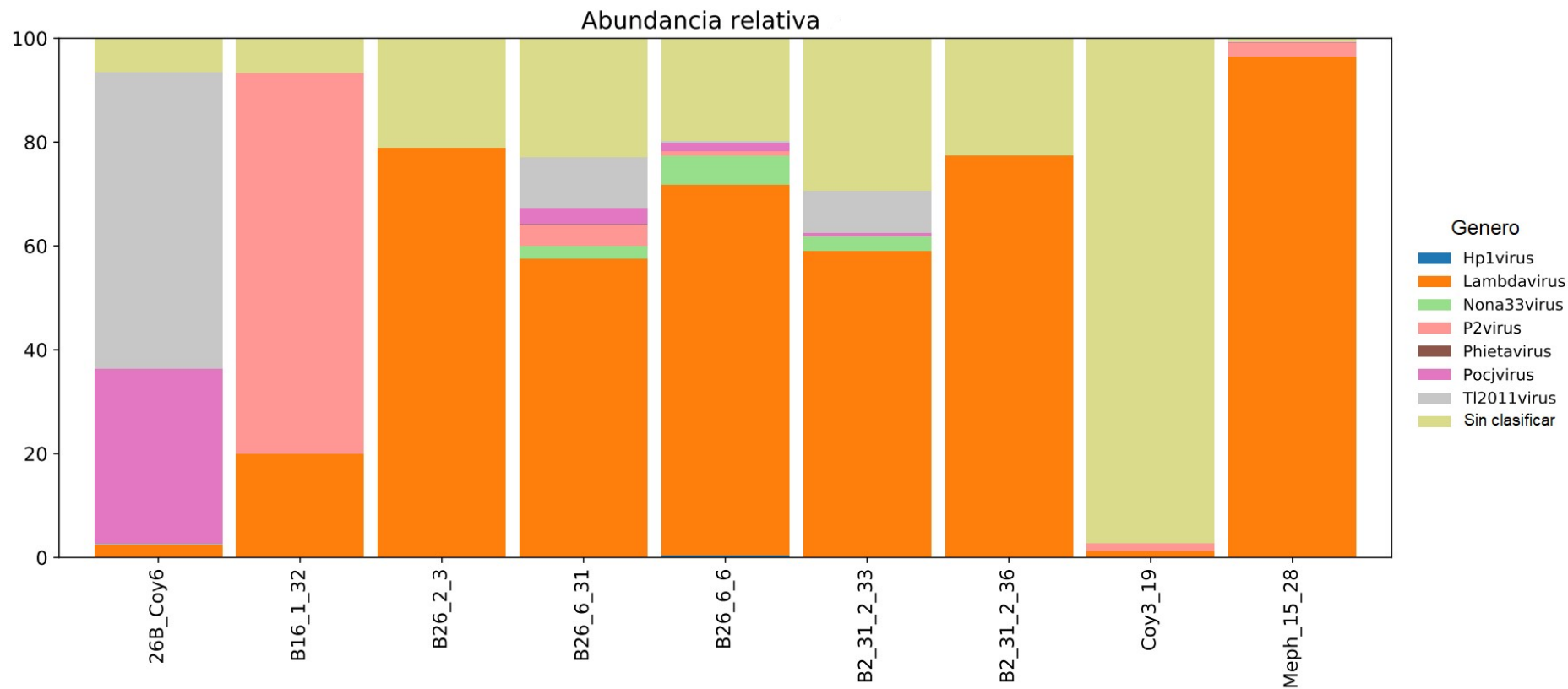


Figura Suplementaria 3. Abundancia relativa de géneros de bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* PGV inducidas con mitomicina C. Se analizó la distribución de géneros de bacteriófagos presentes en nueve cepas de *E. coli* PGV mediante FastViromeExplorer v1.3, utilizando las secuencias contiguas obtenidas a partir de la secuenciación masiva del ADN viral recuperado tras la inducción con mitomicina C. Se muestran los porcentajes de abundancia relativa de cada género de bacteriófago identificado en cada una de las nueve cepas de *E. coli* PGV, reflejando la composición taxonómica a nivel de género de las comunidades virales analizadas.

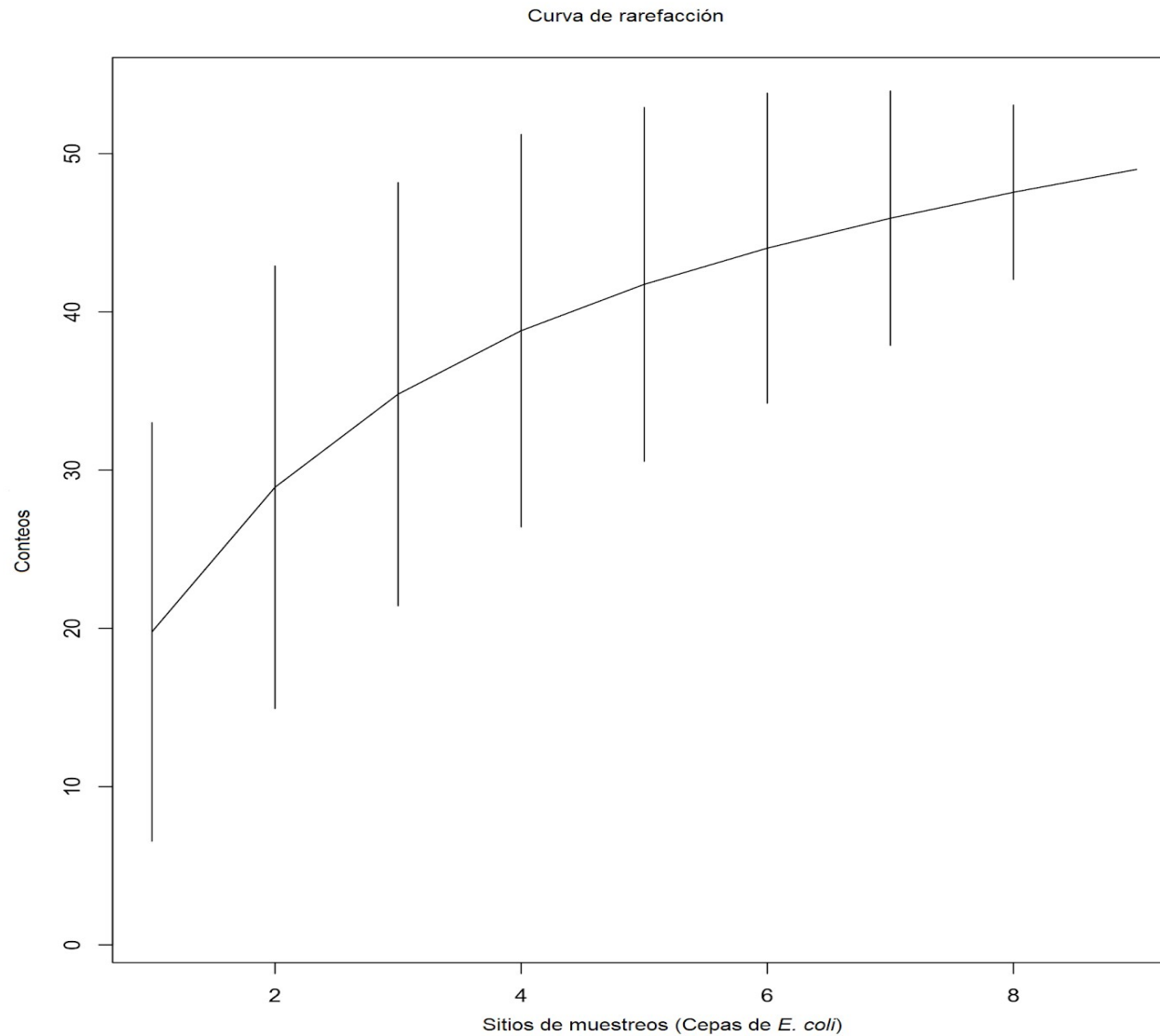


Figura suplementaria 4. Curva de rarefacción de especies de bacteriófagos presentes en las 9 cepas de *E. coli* PGV. La línea sólida representa la riqueza media acumulada de especies calculada mediante el método de rarefacción exacta. Las barras verticales indican la desviación estándar ($\pm$ DE) basada en las permutaciones de los sitios. Se observa un incremento gradual de la riqueza conforme aumenta el esfuerzo de muestreo, alcanzando un total de 49 especies en 9 sitios.

DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se planteó la idea de que los bacteriófagos desempeñan un papel fundamental en la movilización de genes de resistencia antimicrobiana (GRA) y factores de virulencia (FV) en una enterobacteria como lo es *Escherichia coli*, sustentado por la evidencia obtenida en distintos niveles experimentales, las cepas utilizadas para este estudio son provenientes de fauna silvestre.

En primer lugar, se evidenció la presencia de bacteriófagos en el microambiente intestinal de un coyote de vida libre. Mediante un análisis metagenómico de las partículas fágicas intestinales se reveló la presencia de múltiples GRA asociados a distintas especies de bacteriófagos, lo que sugiere que estos no solo almacenan información genética, sino que también tienen el potencial de transferirla entre bacterias dentro de este ecosistema (Chen et al., 2022; Pires et al., 2023). La presencia de bacteriófagos y de GRA en las secuencias de estos bacteriófagos detectados, confirma que estos virus están ampliamente distribuidos en ambientes naturales y que pueden actuar como reservorios y vectores de material genético, propiciando la aparición de bacterias con variantes multirresistentes, lo cual implica un riesgo para la salud pública. No obstante, las inferencias bioinformáticas son importantes para la detección de bacteriófagos y GRA presentes en estos, por lo que no es posible confirmar experimentalmente su funcionalidad ni su capacidad real de transferencia en las condiciones evaluadas.

En este contexto, uno de los aportes más relevantes de este trabajo es la evaluación del líquido ruminal como un componente ambiental capaz de inducir la liberación de bacteriófagos. Los resultados muestran que el líquido ruminal no solo afecta el crecimiento bacteriano, sino que también promueve la inducción de bacteriófagos, evidenciada por el incremento relativo del número de copias en genes estructurales y de virulencia asociados a estos en los sobrenadantes. Este hallazgo resulta particularmente relevante al compararlo con otros estudios donde la inducción de bacteriófagos se asocia principalmente a agentes clásicos como la mitomicina C o a estrés genotóxico (Kizziah et al., 2020; Chaudhari et al., 2021). En contraste, el presente trabajo sugiere que componentes ambientales complejos podrían actuar como inductores naturales, lo que introduce una dimensión ecológica poco explorada en la regulación del ciclo lisogénico-lítico. Sin embargo, no se identificaron los compuestos específicos del líquido ruminal responsables de este efecto, lo que impide establecer un mecanismo claro de inducción.

Esta parte del texto es fundamental para darle relevancia clínica y epidemiológica a tu investigación. He ajustado la redacción para que sea más fluida y precise mejor la relación con el fenómeno de las vacas *super-shedders*, manteniendo la prudencia científica respecto a los resultados obtenidos:

«Asimismo, desde una perspectiva epidemiológica, los resultados de este estudio ofrecen una posible explicación biológica para el fenómeno de las vacas super excretoras de toxina Shiga (Chase-Topping et al., 2008). Es plausible que el microambiente ruminal actúe como un inductor de bacteriófagos portadores de *stx*, desencadenando eventos de lisis que faciliten la THG. Este mecanismo podría derivar en la emergencia de nuevas variantes patógenas y multirresistentes con repercusiones directas en la salud pública. No obstante, dado que en el presente trabajo no se documentó formalmente la THG entre cepas, la confirmación de este proceso como motor directo en la generación de nuevas variantes de *E. coli* STEC requiere de estudios posteriores que permitan validar dicha transferencia en condiciones controladas.

De manera crítica, esto permite plantear que los mecanismos de inducción en ambientes naturales podrían ser más diversos de lo previamente considerado, involucrando no solo la respuesta SOS-RecA, sino también señales metabólicas o interacciones microbianas

específicas. Esta idea es consistente con lo reportado por Hu y colaboradores (2023), quienes describen mecanismos de inducción independientes de RecA, ampliando el panorama clásico de regulación de profagos. En nuestro estudio no se evaluaron marcadores moleculares asociados a la activación del sistema SOS, lo que limita la confirmación directa de las rutas implicadas.

Por otra parte, si bien diversos estudios han documentado la presencia de genes de resistencia en viromas ambientales, estos se han centrado principalmente en su detección y diversidad, sin profundizar en su papel funcional dentro de comunidades específicas. En contraste, los resultados de este trabajo permiten avanzar hacia una interpretación ecológica más integradora, en la que los bacteriófagos no solo están presentes, sino que podrían participar activamente en la dinámica genética del microbioma intestinal, parte de esta dinámica podría ser por competencia, favoreciendo la presencia o la ausencia de GRA y FV, lo cual faltaría por demostrar. Esto coincide con lo reportado por Wang y colaboradores (2025), quienes sugieren que los fagos constituyen reservorios móviles de genes en ambientes con alta presión selectiva, pero difiere en que aquí se propone explícitamente su participación en procesos de movilización dentro de un hospedero silvestre concreto. A pesar de ello, el alcance de este hallazgo se ve acotado debido al número reducido de cepas y el uso de un solo sistema hospedador (*E. coli*), lo que restringe la extrapolación de estos hallazgos a otros contextos ecológicos.

Relacionado a lo anterior, los resultados permiten proponer que la movilización de GRA y FV en ambientes intestinales no es un evento aislado, sino parte de una dinámica ecológica compleja en la que los bacteriófagos median procesos de transducción, contribuyendo a la diversificación genética y a la posible emergencia de cepas con características adaptativas que le confieren ventaja. Esta interpretación se alinea con lo observado en sistemas metagenómicos como el descrito por Michniewski y colaboradores (2019), donde la coexistencia de múltiples fagos y bacterias favorece redes de intercambio genético; sin embargo, en este estudio se añade el componente de fauna silvestre, lo que amplía la relevancia ecológica y epidemiológica del fenómeno. A pesar de ello, no se evaluaron directamente eventos de transducción, por lo que la participación de los bacteriófagos en estos procesos se infiere a partir de la composición genética observada.

Estos hallazgos permiten plantear una posible explicación ecológica para la presencia de cepas STEC en ambientes asociados a rumiantes. La capacidad del líquido ruminal para inducir bacteriófagos portadores de genes como *stx* sugiere que este microambiente podría actuar como un catalizador en la emergencia de variantes patogénicas de *E. coli*, facilitando la transferencia de factores de virulencia entre cepas bacterianas. En este sentido, los resultados concuerdan con lo descrito por Greig y colaboradores (2022), quienes documentan la asociación de bacteriófagos con genes de virulencia, pero aquí se aporta una posible explicación ambiental para su activación y diseminación. Aun así, no se realizaron ensayos funcionales que permitan confirmar la expresión o transferencia efectiva de estos genes en condiciones naturales.

Finalmente, la integración de los resultados obtenidos en las cepas de *E. coli* PGV permite reforzar la idea de que los bacteriófagos participan activamente en la transferencia horizontal de FV y GRA. La identificación de múltiples bacteriófagos inducidos, así como la detección de genes de virulencia y resistencia en sus genomas, sugiere que estos virus pueden ser liberados al ambiente tras eventos de inducción, contribuyendo al flujo génico entre distintas bacterias. Este comportamiento ha sido reportado por Carter y colaboradores (2021), quienes describen eventos colectivos de liberación de fagos en poblaciones bacterianas; sin embargo, en este estudio se propone además que esta coexistencia podría traducirse en eventos funcionales de movilización genética dentro de un mismo nicho ecológico. No obstante, no se puede descartar que parte de la diversidad observada corresponda a artefactos del ensamblaje metagenómico o a variación intra-poblacional.

En conjunto, los resultados de este estudio no solo validan la hipótesis planteada, sino que amplían el marco conceptual sobre el papel de los rumiantes en la inducción de bacteriófagos y su impacto tanto en la ecología microbiana como en la emergencia de variantes patógenas de relevancia para la salud pública. A diferencia de las aproximaciones puramente descriptivas previas, este trabajo propone un modelo integrador donde la interacción entre el hospedador, el microambiente gastrointestinal y factores químicos como el líquido ruminal modulan la dinámica poblacional de los bacteriófagos y, consecuentemente, la THG. Estos hallazgos posicionan al ecosistema ruminal como un elemento determinante en la evolución bacteriana y la plasticidad genómica, subrayando la necesidad de estudios futuros que validen experimentalmente los mecanismos propuestos y profundicen en las interacciones moleculares que gobiernan esta compleja dinámica viral.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conjunto, los resultados obtenidos validan las hipótesis planteadas al evidenciar la presencia de bacteriófagos portadores de factores de virulencia (FV) y genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) en ambientes gastrointestinales. Se confirma la capacidad del líquido ruminal para inducir bacteriófagos en cepas de *Escherichia coli* de fauna silvestre, favoreciendo procesos de lisis y la liberación de fagos portadores de *stx1*, lo cual subraya el papel determinante del microambiente ruminal en la movilización génica. Asimismo, se observa que la liberación de bacteriófagos por parte de estas cepas sigue una dinámica ecológica de competencia y exclusión, la cual modula indirectamente la transferencia de FV y GRA. Aunque ciertos mecanismos propuestos requieren validación experimental adicional, estos hallazgos respaldan la participación del microambiente ruminal en la inducción de fagos, aportando evidencia de que los factores ambientales modulan la plasticidad genómica. En consecuencia, se consolida un modelo donde la interacción entre el rumiante, la microbiota bacteriana y los bacteriófagos contribuye significativamente a la evolución de *E. coli* y a la transferencia horizontal de genes (THG), reafirmando su relevancia en la salud pública y ambiental.

Referencias Bibliográficas

- Carter, C. C., Fierer, J., Chiu, W. W., Looney, D. J., Strain, M., y Mehta, S. R. (2016). A Novel Shiga Toxin 1a-Converting Bacteriophage of *Shigella sonnei* With Close Relationship to Shiga Toxin 2-Converting Phages of *Escherichia coli*. *Open forum infectious diseases*, 3(2), ofw079. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw079>
- Chaudhari, H. V., Inamdar, M. M., y Kondabagil, K. (2021). Scaling relation between genome length and particle size of viruses provides insights into viral life history. *iScience*, 24(5), 102452. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102452>
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L. y Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature reviews. Microbiology*, 6(12), 904–912. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2029>
- Chen, Q., Dharmaraj, T., Cai, P. C., Burgener, E. B., Haddock, N. L., Spakowitz, A. J., y Bollyky, P. L. (2022). Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics. *Pharmaceutics*, 14(7), 1425. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071425>
- Greig, D. R., Bird, M. T., Chattaway, M. A., Langridge, G. C., Waters, E. V., Ribeca, P., Jenkins, C., y Nair, S. (2022). Characterization of a P1-bacteriophage-like plasmid (phage-plasmid) harbouring blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serovar

Typhi. Microbial genomics, 8(12), mgen000913.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000913>

Hu, J., Wu, Y., Kang, L., Liu, Y., Ye, H., Wang, R., Zhao, J., Zhang, G., Li, X., Wang, J., y Han, D. (2023). Dietary D-xylose promotes intestinal health by inducing phage production in *Escherichia coli*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41522-023-00445-w>

Kizziah, J. L., Rodenburg, C. M., y Dokland, T. (2020). Structure of the Capsid Size-Determining Scaffold of "Satellite" Bacteriophage P4. *Viruses*, 12(9), 953.
<https://doi.org/10.3390/v12090953>

Michniewski, S., Redgwell, T., Grigonyte, A., Rihtman, B., Aguilo-Ferretjans, M., Christie-Oleza, J., Jameson, E., Scanlan, D. J., y Millard, A. D. (2019). Riding the wave of genomics to investigate aquatic coliphage diversity and activity. *Environmental microbiology*, 21(6), 2112–2128. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14590>

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

Wang, Q., Wang, M., Yang, Q., Feng, L., Zhang, H., Wang, R., y Wang, R. (2025). The role of bacteriophages in facilitating the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 268, 122776. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122776>