



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL
ECUADOR**

TRABAJO DE TITULACIÓN

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

**Análisis comparativo de genomas de bacteriófagos líticos
con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias del
género *Listeria* spp**

GALO JAVIER GRANDA JÁTIVA

TUTOR: MIGUEL ANGEL MENDEZ

ABRIL 2025

Índice

Índice	4
1. Introducción	7
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo General	9
2.2. Objetivos Específicos	9
3. Marco Teórico	10
3.1. Bacteriófagos.....	10
3.1.1. Estructura.....	11
3.1.2. Taxonomía.....	12
3.1.3. Mecanismos de Replicación	14
3.1.4. Mecanismo de lisis de los bacteriófagos	18
3.2. Listeria spp	20
3.2.1. Generalidades	20
3.3. Resistencia a los antimicrobianos	21
3.4. Genómica Comparativa.....	22
3.5. Análisis Filogenético.....	23
4. Metodología.....	24
4.1. Aislamiento y Caracterización del Bacteriofago p35.	24
4.2. Análisis comparativo de genomas de Bacteriófagos	27
4.3. Obtención y anotación de secuencias de genomas completos de bacteriófagos.....	27
4.4. Alineamiento y análisis filogenético	28
4.5. Anotación del genoma del bacteriófago p35	29

4.6.	Predicción de la traducción proteica	30
5.	Resultados	31
5.1.	Características Genómicas.....	31
5.2.	Árbol Filogenético	33
5.3.	Anotación genómica Bacteriófago p35.....	36
5.4.	Anotación funcional proteínas líticas del Bacteriófago p35.....	44
6.	Análisis de resultados	48
6.1.	Características genómicas	49
6.2.	Árbol Filogenético	51
6.3.	Anotación genómica Bacteriófago p35.....	52
7.	Conclusiones y Recomendaciones	56
7.1.	Conclusiones	56
7.2.	Recomendaciones.....	58
8.	Referencias	59

Índice de Tablas y figuras

Figura 1 Estructuras proteicas que componen los bacteriófagos. A) Bacteriófago con simetría icosaedro B) Bacteriófago filamentoso	12
Figura 2. Morfología y estructura de los bacteriófagos	14
Figura 3. Ciclos de vida de los Bacteriófagos (Vía lisogénica y Vía lítica)	16
Figura 4. Metodología utilizada en la construcción del árbol filogenético en el programa MEGA X.....	34
Figura 5 Árbol Filogenético.....	35
Figura 6. Anotación del genoma del bacteriófago p35 extraído del programa DFAST.....	37
Figura 7. Estructura modular del genoma del bacteriófago p35.....	40
Figura 8 . Mapa genómico del bacteriófago p35, extraído del programa SnapGene Viewer, módulo de cápside en color naranja, módulo de lisis en color azul, módulo de cola en color amarillo y módulo de recombinación de ADN en color verde, proteínas hipotéticas en color verde, proteínas hipotéticas en color gris.	41
Figura 9. Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 18 (HOLINA), extraído de DFAST...	45
Figura 10. Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 28 (ENDOLISINA), extraído de DFAST	46
Figura 11. Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 30 (ENDONUCLEASA),extraído de DFAST	47

1. Introducción

A nivel mundial, la habilidad de las bacterias para desarrollar resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en un desafío significativo para la salud pública, según lo atribuye la Organización de las Naciones Unidas (ONU), esto es una situación que representa una de las mayores amenazas para la salud a nivel mundial, debido que compromete objetivos cruciales como el avance del desarrollo humano.

En vista de las profundas implicaciones en las actividades económicas, la alimentación, el turismo y las corrientes migratorias, a partir de esta redefinición se han instaurado mecanismos de cooperación, consulta y vigilancia con mayor o menor apoyo de cada país (Cerezo, 2020). En Ecuador, la situación es especialmente preocupante, con un aumento en la prevalencia de bacterias multirresistentes en hospitales y comunidades. A causa de este problema, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se vuelve imperativa. Los bacteriófagos, son virus que infectan específicamente a bacterias que usan su maquinaria genómica para replicarse lo que ocasiona la lisis de la bacteria, emergen como una prometedora opción para combatir infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos (Punil, 2017). Sin embargo, no existen estudios contundentes en el país que se identifiquen estos virus a pesar de que corresponden a una alternativa a la problemática de la resistencia a los antimicrobianos, es por esto por lo que el analizar los genomas completos y comprender porque son capaces de desarrollar la capacidad lítica.

Este estudio se centra en el análisis bioinformático del genoma del bacteriófago p35, aislado de aguas. La elección de este fago es debido a la prevalencia de *Listeria monocytogenes* y su capacidad para causar enfermedades graves en humanos. A

través de un análisis genómico comparativo y filogenético exhaustivo, se busca identificar genes líticos, como lisozimas, endolisinas y holinas, que confieran al fago p35 su capacidad de lisar bacterias. Los resultados de esta investigación permitirán comprender mejor los mecanismos moleculares de la infección por bacteriófagos y contribuirán a la identificación de nuevos fagos líticos con potencial terapéutico para el tratamiento de infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* y otras bacterias patógenas y a identificar nuevos candidatos para el descubrimiento fagoterapias personalizadas para abordar las infecciones provocadas por bacterias con resistencia a diversos los antimicrobianos en Ecuador.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Identificar computacionalmente genes líticos en bacteriófagos de *Listeria spp.* para evaluar su potencial como marcadores moleculares en la búsqueda de nuevos fagos líticos.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar un conjunto representativo de genomas de bacteriófagos de *Listeria spp.* disponibles en bases de datos públicas.
- Identificar genes conservados entre los diferentes genomas, como los que codifican proteínas líticas.
- Realizar una alineación múltiple de las secuencias de los genomas seleccionados con la utilización de un algoritmo de alineación múltiple adecuado.
- Construir árboles filogenéticos utilizando métodos de máxima verosimilitud.
- Identificar clados principales y subclados de bacteriófagos de *Listeria spp.*

3. Marco Teórico

3.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus especializados en infectar bacterias, con una estructura simple que se basa en ácido nucleico cubierto por proteínas que forman parte de su envoltura o cápside la cual les permite identificar y penetrar células específicas. Son considerados los organismos más abundantes del planeta tierra, se estima que existe un total de entre 10^{30} a 10^{32} partículas víricas y juegan un rol crucial en el equilibrio de los ecosistemas bacterianos, generalmente habitan en ecosistemas con alta carga de bacterias (Punil, 2017), han sido llamados como los organismos más abundantes en la Tierra, superando incluso a las bacterias. Debido a que se encuentran en prácticamente todos los ambientes, desde el mar hasta el suelo, éstos han sido aislados desde aguas residuales, hasta muestras de tierra (Segundo A., Hernández B., López V., & Torres A., 2010).

Los bacteriófagos son considerados como parásitos intracelulares obligados ya que para su replicación necesitan infectar bacterias, aprovechando las estructuras celulares para liberar su progenie. (Monk, Rees, Barrow, Hagens, & Harper, 2010), son específicos ya que solo pueden infectar ciertos tipos de bacterias, a las que reconocen y penetran para inyectar su material genético (Prada et al., 2015).

El genoma de los bacteriófagos puede estar conformado por DNA o RNA bien sea de simple o doble cadena el cual está cubierto por una cápside formada de proteínas. La estructura de los bacteriófagos es determinada por sus proteínas de envoltura (o proteínas estructurales) cuya función principal es la de proteger al material genético fágico (Segundo A., Hernández B., López V., Torres A., 2010).

Los bacteriófagos se utilizan como una herramienta para la transformación genómica bacteriana, y sirven, además, para la elaboración de vacunas, siendo una alternativa para el manejo de infecciones también llamada fagoterapia (Hernández, 2007).

3.1.1. Estructura

El tamaño de los bacteriófagos oscila entre los 20 y 200 nm (Fernández, Gutiérrez, Rodríguez, García, 2020). Su estructura está definida según la conformación de las proteínas de su envoltura cuya función es la de proteger al material genético, además estas proteínas conforman las distintas partes del fago como son: el cuello, cola, fibras caudales, láminas basales y/o espículas (Segundo A., Hernández B., López V., & Torres A., 2010).

Estructuralmente se encuentran tres distintas formas generales en las que está formado un bacteriófago: Una cabeza icosaédrica con cola, una cabeza icosaédrica sin cola y de forma filamentosa (Auszustyn et al., 2018). Los bacteriófagos cuya estructura está formada por una cabeza icosaédrica y cola helicoidal son considerados como los más complejos (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015).

Figura 1 Estructuras proteicas que componen los bacteriófagos. A) Bacteriófago con simetría icosaedro B) Bacteriófago filamentoso

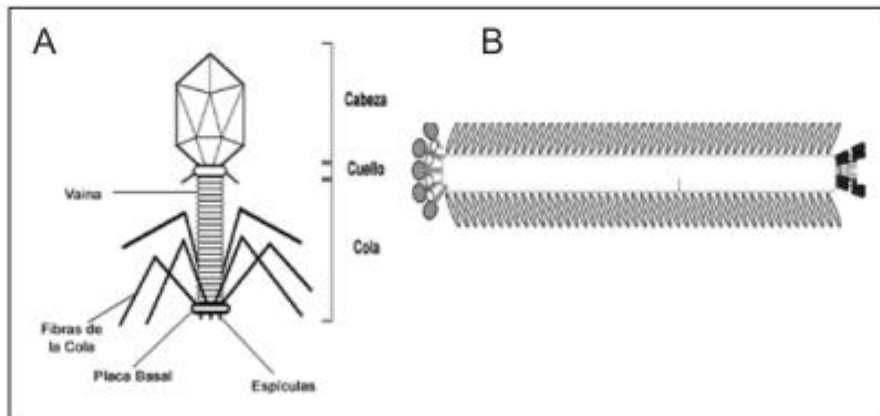


Figura extraída de : (Segundo et al. 2010).

Uno de los fagos que más se ha descrito es el fago T4 específico para *Escherichia coli*, que se compone de una cola con al menos 20 proteínas que dependen entre sí, una cabeza con mayor cantidad de proteínas, el ensamblaje de ambas partes suele ser un proceso complicado ya que la cola se forma de manera independiente antes de unirse con la cabeza del fago (Madigan et al., 2015).

3.1.2. Taxonomía

La estructura de los bacteriófagos ha sido ampliamente estudiada desde mediados del siglo XX. Los resultados obtenidos indican que la presencia de una cola es una característica común en el 96% de los fagos analizados. Esta estructura, junto con otras características morfológicas, permite clasificar a estos virus en diferentes

familias, siendo las más representativas *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, (Dini, 2011).

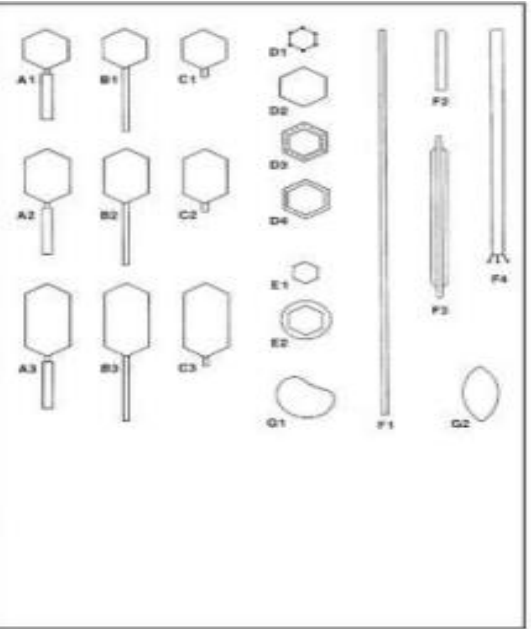
En el año de 1966 se estableció el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), con la finalidad de implementar un esquema único y universal para clasificar a cientos de virus aislados de humanos, animales, plantas y bacterias (Murphy et al., 1995). La clasificación se basa según el tipo de ácido nucleico, morfología o por sistemas taxonómicos basados en secuencias (Rohwer & Edwards, 2002). Inclusive se los clasifica según su modo de replicación, el organismo huésped y el tipo de enfermedad (White & Orlova, 2016).

La clasificación de los fagos está basada principalmente en dos características, morfología y tipo de genoma. Morfológicamente fue la primera clasificación que se les dio basándose en sus características esto mucho antes de contar con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación de genomas (Turner & Kropinski, 2021). Según esta característica se pueden encontrar fagos filamentosos, envueltos en una bicapa lipídica, o con una cápside proteica que incorpora lípidos. (White & Orlova, 2016) Además, muchos fagos presentan una simetría icosaédrica y una cola.

En cuanto al genoma, puede ser de ADN o ARN, de cadena sencilla o doble, y circular o lineal (Carter & Saunders, 2007). La clasificación taxonómica de los fagos, basada en estas características, ha identificado al menos 13 familias virales (Ackermann, 2000).

Figura 2. Morfología y estructura de los bacteriófagos

Morfortipo	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	Cubierta lipídica
E2	ARN dc, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>		
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos
F2		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	b- bastones cortos
F3				Cubierta lipídica
F4				Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuselloviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón



Extraído de : (Ackermann, 2000), editado por el autor 2025

3.1.3. Mecanismos de Replicación

Los bacteriófagos al ser parásitos intracelulares obligados, no pueden replicarse por sí solos, estos agentes infecciosos dependen de una célula huésped bacteriana para llevar a cabo su ciclo de vida. Para lograr esto, los fagos han desarrollado dos estrategias de replicación, las cuales se presentan de forma esquemática en la figura 2 (Segundo A., Hernández B., López V., & Torres A., 2010).

Dependiendo de su ciclo de vida los Bacteriófagos se pueden dividir en dos grandes grupos:

- Fagos temperados o avirulentos: En este caso el ADN viral se integra al material genético de la bacteria infectada y se replica junto con la misma

transmitiendo de generación en generación si producir la lisis de la célula infectada este proceso es también conocido como lisogenia a la cepa así infectada como lisogénico y al DNA viral integrado como profago(Moyano, 2019).

- Fagos líticos o virulentos: en este caso los bacteriófagos poseen genes que traducen a proteínas líticas que provocan la lisis de las células hospedadoras, liberando una nueva progenie fágica en un proceso conocido como ciclo lítico (Moyano, 2019).

Dentro del ciclo lítico, el fago se une a la célula bacteriana e introduce su información genética en ella, secuestra la maquinaria celular para producir numerosas copias de sí mismo y, finalmente, lisa la célula para liberar a los nuevos viriones. Por otro lado, en el ciclo lisogénico, el ADN viral se integra al cromosoma bacteriano, convirtiéndose en un profago. En este estado, se replica pasivamente con el ADN bacteriano, siendo transmitido a las células hijas. El profago puede permanecer latente durante generaciones, pero bajo ciertas condiciones, puede activarse, entrando en el ciclo lítico. Ambos ciclos tienen profundas implicaciones biológicas, desde el control de poblaciones bacterianas hasta la evolución de los genomas bacterianos, y encuentran aplicaciones en diversos campos como la biotecnología y la medicina (Segundo A., Hernández B., López V., & Torres A., 2010).

Figura 3. Ciclos de vida de los Bacteriófagos (Vía lisogénica y Vía lítica)

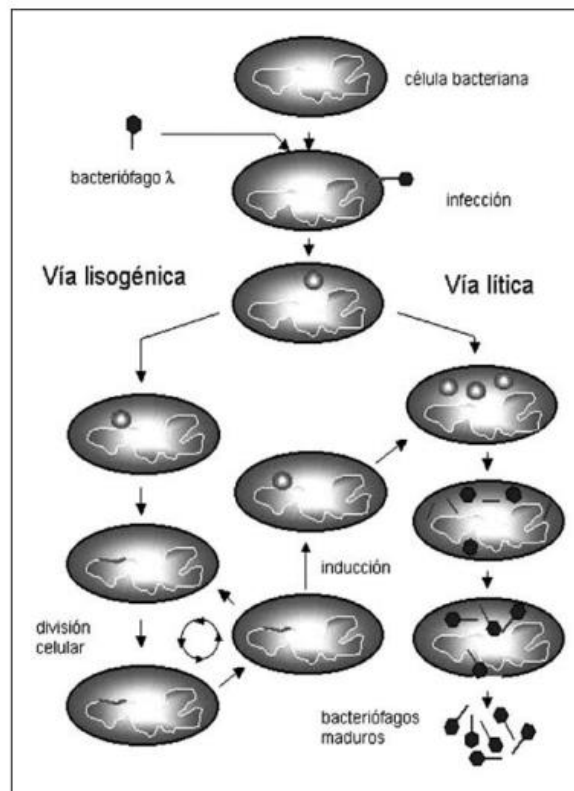


Figura extraída de : (Segundo et al. 2010).

3.1.3.1. Ciclo Lítico

Los fagos virulentos están restringidos al ciclo lítico, un proceso en el cual se multiplican dentro de una bacteria y, al finalizar, la lisan para liberar nuevos virus. (Fernandez, Leal Duarte, Agun, & Jurado Muñoz, 2023). Lo que le da una relevante importancia en la aplicación de fagoterapia (Gill & Hyman, 2010). La resistencia que tenga la bacteria target del bacteriófago no influye en la capacidad lítica (Orlova, 2012).

Este ciclo consta de varias fases desde que el bacteriófago ingresa a la célula hospedera y que termina con la liberación de la partícula viral. Las fases se describen de la siguiente manera:

1. La partícula del fago se une a la superficie de la célula huésped;
2. El fago introduce el ácido nucleico dentro de la bacteria.
3. Los genes tempranos del fago se expresan, lo que conlleva a la síntesis de las proteínas;
4. El fago replica su genoma;
5. se activan los genes tardíos del fago, que producen los componentes necesarios de las nuevas partículas;
6. Las cabezas de los fagos se construyen, su material genético se introduce en el interior de estas cápsides y unión de cabezas y colas; y
7. Lisis de la bacteria huésped y liberación de las nuevas partículas de fago (Fernandez, Leal Duarte, Agun, & Jurado Muñoz, 2023)

El primer paso de este ciclo consiste en la adsorción del bacteriófago a los receptores de la superficie celular de la bacteria. Este acoplamiento es muy específico, de forma que sólo tiene lugar cuando la cola del fago y los receptores tienen configuraciones complementarias (Moyano, 2019).

La inyección consiste en la transferencia del ADN del bacteriófago desde su cabeza hacia el citoplasma bacteriano, utilizando la cola del fago como conducto. Una vez completado este proceso, la partícula del fago, ahora vacía, permanece en el exterior. Este proceso de inyección al parecer es dependiente de la energía producida por el celular y de su maquinaria de síntesis de proteínas (Watanabe and Takesue 1973; Watanabe, Takesue, and Ishibashi 1979).

Después de la introducción del ADN viral, la bacteria cesa la producción de sus propios ácidos nucleicos y proteínas, y su genoma comienza a descomponerse. La maquinaria metabólica del hospedador se pone al servicio del virus, así realiza la síntesis de sus ácidos nucleicos y proteínas (Moyano, 2019).

3.1.3.2. Ciclo Lisogénico

En este ciclo los bacteriófagos insertan su material genético en la célula huésped lo que se conoce como “profago”, ya sea en forma de plásmido (C. Torres, 2018), o en el interior de una región específica del cromosoma bacteriano, por lo tanto, éste se replica juntamente con la célula huésped y se transmite a la progenie (Orlova, 2012). Los fagos capaces de lisogenia, conocidos como templados, portan genes que codifican enzimas particulares, incluyendo un represor transcripcional. Este ciclo no tiene una aplicación dentro de la fagoterapia ya que no termina con la muerte de la bacteria (Gill & Hyman, 2010).

3.1.4. Mecanismo de lisis de los bacteriófagos

La capacidad lítica de los bacteriófagos, depende de la acción de dos proteínas que le permiten la adsorción y posterior lisis de la célula infectada, es la acción conjunta de estas proteínas lo que ocasiona que los bacteriófagos que cumplen con un ciclo lítico ocasionen la muerte de la bacteria hospedera, para lograr la lisis, los fagos de ADN bicatenario recurren a la degradación activa de la peptidoglicina con una enzima muralítica o endolisina que posee una o más de cuatro actividades muralíticas diferentes, pero carece de una secuencia señal secretora, se acumula

en un estado completamente plegado y activo en el citosol. Como mínimo, la lisis requiere otro gen que codifica una pequeña proteína de membrana llamada holina. En el momento en que se "programa" en la estructura del gen de la holina, la endolisina accede repentinamente a su sustrato, la pared celular; la destrucción de la mureína y la ruptura de la célula son consecuencias inmediatas.

Las holinas son pequeñas proteínas que se insertan en la membrana celular y tienden a acumularse en la superficie hasta que, en un momento específico, programado en el gen de la holina, la membrana se permeabiliza repentinamente a la endolisina completamente plegada, la unión de la holina está asociada con un colapso del potencial de membrana y la permeabilización de la membrana. (

Las endolisinas son proteínas con un rango de peso molecular entre los 15-40 kDa (Abdelrahman et al., 2021). Estas enzimas se componen de una región con actividad catalítica y, en ciertos casos, también poseen una región que les permite unirse a la pared celular. Este último es responsable del reconocimiento del sustrato y de su especificidad (Murray et al., 2021; Lai, Chen, Ho, Xia & Leung, 2020).

3.2. *Listeria* spp

3.2.1. Generalidades

Son bacilos Gram positivos pequeños y rectos, sin esporas ni ramificaciones, que suelen encontrarse solos o formando cadenas cortas. En cultivos más antiguos pueden formar filamentos más largos. Estos bacilos tienen de 1 a 5 flagelos que les permiten moverse a temperaturas templadas. (Oteo & Alós, 2009)., pueden crecer en un amplio rango de temperaturas que van desde 0.5° C hasta 45 °C y condiciones de pH (4.7- 9.2) (Skowron et al., 2018).

La gran habilidad para colonizar y crecer en diversos ecosistemas se debe a la presencia de 331 genes que codifican para varias proteínas de transporte (K. Torres, Sierra, Poutou, Carrascal, & Mercado, 2005). Por lo que ha sido posible aislar esta bacteria de suelos, materia vegetal, aguas residuales, comida animal y en alimentos de consumo humano como son productos lácteos no pasteurizados, verduras entre otros (Oteo & Alós, 2009).

Entre las 17 especies del género *Listeria*, únicamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido establecidas como patógenos humanos (Vos y col., 2011). Siendo capaces de colonizar y afectar al tracto intestinal humano causando una enfermedad grave conocida como listeriosis (Skowron et al., 2018).

3.3. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un proceso natural, que se define como la capacidad que tiene un microorganismo ya sean virus, bacterias, parásitos u hongos para contrarrestar o soportar el efecto del medicamento antimicrobiano ya sea un antibiótico, antiviral, antiparasitario o antifúngico. (MSP,2018).

La capacidad de los microorganismos para generar resistencia los antimicrobianos ha ido evolucionando a través del tiempo por lo que ha convertido a las infecciones en un grave problema a la salud pública que cada vez es más difícil de contrarrestar, ocasionando un aumento en la tasa de mortalidad, enfermedades y gasto en salud (Prada et al., 2015). La principal causa que ha desencadenado esta problemática ha sido sin duda, el mal uso y el abuso de los antimicrobianos lo que ha favorecido para que los microorganismos evolucionan y generen cada vez más mecanismos para resistir a los medicamentos, ocasionando que pierdan su eficacia en el momento de un tratamiento. (Cires, 2002).

Existen dos formas en que los microorganismos generan la resistencia, ya sea natural o adquirida. La resistencia natural es propia de cada microorganismo sin embargo en el caso de la resistencia adquirida aparece como una respuesta de defensa desarrollan los microorganismos al estar expuestos a los antimicrobianos, a través de procesos bioquímicos, la resistencia adquirida. Éste último mecanismo es preocupante, puesto que permite la dispersión de la resistencia favoreciendo a la aparición de brotes a nivel hospitalario (MSP,2018).

Durante la 68ª Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en mayo de 2015, los Estados Miembros acordaron adoptar el Plan de Acción Global contra la Resistencia a los Antimicrobianos, comprometiéndose a desarrollar y poner en práctica el Plan de acción para la RAM para abordar este problema. Hasta la fecha, siete países de Latinoamérica han formalizado este documento. Ecuador cuenta con el Plan Nacional para la prevención y control de la RAM 2019-2023 y está próximo a oficializarlo mediante Acuerdo Ministerial (MSP,2018).

3.4. Genómica Comparativa

La genómica comparativa se dedica al análisis de las similitudes y divergencias entre genomas de diferentes especies. Los procesos de selección natural imponen restricciones y presiones sobre las secuencias funcionales, lo que resulta en patrones detectables en las alineaciones múltiples de secuencias. (Miller, Makova et al. 2004).

Esta estrategia pretende aprovechar el conocimiento que proporcionan las firmas de selección natural para comprender la función de los genomas y los procesos evolutivos que los moldean.

3.5. Análisis Filogenético

El análisis filogenético es considerado como un objetivo principal en biología, esto debido a que se puede considerar que la filogenia permite dar sentido y una perspectiva a toda la información generada a través de datos biológicos en las diferentes ramas de la biología. Si no se cuenta con la estructura que proporciona la filogenia, la biología se reduce a una extensa acumulación de hechos aislados y poco relacionados entre sí. Adicionalmente, la filogenia ocupa un lugar central en la sistemática y la taxonomía, al ayudar a resolver problemas de posición y nomenclatura (Forey, 1992)

El análisis filogenético permite reconstruir la historia evolutiva de los fagos mediante la comparación de secuencias genéticas. En el caso de los fagos, se utilizan genes altamente conservados como el de la polimerasa de ADN, terminasa, cápside mayor, entre otros (Rohwer & Edwards, 2002). Dado que los fagos tienen genomas altamente mosaicos, a menudo se prefiere el enfoque basado en genes individuales o grupos ortólogos, en lugar del análisis del genoma completo.

Los métodos clásicos incluyen la alineación de secuencias (por ejemplo, con Clustal Omega o MAFFT), la construcción de árboles filogenéticos usando algoritmos como Neighbor-Joining, Maximum Likelihood o Bayesian Inference (Tamura et al., 2013). Más recientemente, se han utilizado métodos de filogenómica, que integran cientos de genes, y enfoques basados en redes, que capturan la naturaleza recombinante del genoma fágico (Bin Jang et al., 2019).

4. Metodología

4.1. Aislamiento y Caracterización del Bacteriófago p35.

La metodología seguida para el aislamiento bacteriófagos líticos se describe completamente un estudio previo realizado por Granda y colaboradores en el 2021.

El estudio se desarrolló en el laboratorio de investigación del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP), en la ciudad de Quito . Para lo cual, se parte del aislamiento de cepas guarradas en el cepario del CNR-RAM, posterior se sembró en medio agar sangre y se realizó la identificación mediante pruebas bioquímicas.

Para el aislamiento de los bacteriófagos se muestreo agua residual del río Machángara en la ciudad de Quito, esto debido a que estos virus se encuentran en grandes cantidades en aguas residuales, posteriormente se realizó un pre-tratamiento del agua residual y para aislar los bacteriófagos, se empleó la técnica de cultivo en doble capa, se verificó que existan calvas de lisis según la metodología planteada y se comprobó que estos bacteriófagos sean líticos para las bacterias del género *Listeria*.

Finalmente, se realizó la caracterización morfológica y molecular del bacteriófago aislado, esta metodología se describe en la publicación realizada en 2023 por Granda y colaboradores, donde se realizó la descripción morfológica del bacteriófago aislado mediante microscopía electrónica de transmisión analizando en Laboratorio Centro

de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas. El procedimiento consistió en depositar suavemente alrededor de 10 µl de una suspensión de bacteriófagos purificados sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono. Tras un breve periodo, el líquido remanente se absorbió con papel de filtro. Luego, las rejillas se sometieron a tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y se secaron con aire en una campana de flujo laminar. Las partículas de fago así preparadas se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión TEM (FEI, TECNAI, G2 spirit twin, Holanda) operado a 100 kV. Las dimensiones de las partículas virales se determinaron con el software ImageJ, calibrando la escala con las barras incluidas en las micrografías obtenidas. Los bacteriófagos fueron identificados a nivel de familia según su morfología y se compararon con diversas fuentes, como la base de datos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus y el libro *Advances in virus research* (Granda, et al, 2023).

Los bacteriófagos fueron caracterizados molecularmente a través de la amplificación de genes únicos de cada fago, que fueron seleccionados como marcadores moleculares para la identificación de la especie de cada fago de *Listeria* spp, esto se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se localizaron genes o regiones codificantes (ORFs) específicas en cada uno de los bacteriófagos, las cuales no mostraron homología con cepas de *Listeria* ni con otros fagos conocidos para que así se pueda discriminar y determinar que dicha amplificación corresponde al fago estudiado. A partir de este análisis, se eligieron las siguientes regiones: gp20 del fago P40, gp21 del fago P35 y gp20 del fago P100 (Granda, et al, 2023).

Los cebadores fueron diseñados mediante el software SnapGene, y su potencial funcional se evaluó utilizando la base de datos BLAST: para la región gp 20

YP_002261436.1 del bacteriófago P 40 NC_011308.1, forward (AGGTTTCGAAAGGAGAACTCTCGG), reverse (AGGCTTTTTGAAGAATGCCCCCG). De la región gp21 YP_001468805.1 del bacteriófago P 35 NC_009814.1, directa (GGGATAATATATATCAGAACGCGCC), inversa (GCTCCTCCTCGGGTGTTAATTGGT). Y de la región gp 20 AAY53323.1 del bacteriófago P 100 DQ004855.1; directa (GCCCTTGTATGAACAAGTCC), inversa (CAAACATCCCTTCGTAGAACCC). El volumen final de reacción de PCR fue de 25 μ l preparada a partir de 12 μ l de GoTaq® Green, 10 μ l de agua ultrapura libre de nucleasas, 1 μ l de ADN del bacteriófago a una concentración de 30 μ g/ μ l y 1 μ l de cada cebador específico para los bacteriófagos (P 40, P 35 y P 100), se incorporaron cebadores específicos para *Listeria* spp., diseñados a partir de ORFs únicos detectados en los genomas de los bacteriófagos (regiones exclusivas que no presentan homología con cepas de *Listeria* ni con otros fagos), con el objetivo de diferenciarlos. Tras la preparación de la mezcla de reacción, las muestras fueron colocadas en el termociclador, el cual se programó con las condiciones de amplificación correspondientes (Granda, et al, 2023).

El programa del termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de PCR. Cada ciclo incluyó una desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, una hibridación con un gradiente de temperatura de 48 °C a 53 °C durante 45 segundos (con un rango de 5 °C), y una elongación a 72 °C por 1 minuto. Los fragmentos de ADN fueron visualizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Granda, et al , 2023).

4.2. Análisis comparativo de genomas de Bacteriófagos

Con la finalidad de comprender la relación genómica existente entre el bacteriófago p35 previamente caracterizado en este estudio, fue aislado de muestras de agua residual del río Machángara, localizado en la ciudad de Quito, se procedió a realizar un análisis de genómica comparativa de dicho genoma cuya secuencia ha sido descrita por Dorschty colaboradores en 2009 y subida a la bases de datos pública del NCBI, el análisis comparativo se basó en alineamiento de los genomas completos de 11 bacteriófagos de *Listeria* spp , construcción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud, comparación de las variables genéticas como longitud del genoma, cantidad de genes, estructura del genoma, porcentaje de G+C , número de ORFs predichos y características morfológicas de los bacteriófagos.

4.3. Obtención y anotación de secuencias de genomas completos de bacteriófagos

Para la obtención de la secuencia del genoma completo del bacteriófago p35 se descargó de la base de datos pública NCBI esto debido a que por presupuesto y tiempo del estudio anterior no se logró secuenciar el genoma completo, también se descargaron 11 secuencias de otras especies de bacteriófagos que han sido completamente descritos y entre los más comunes en su capacidad inhibitoria para *Listeria* spp este se considera un número representativo y significativo de bacteriófagos por las características mencionadas. Se realizó el análisis comparativo basándose siempre en comparar el bacteriófago p35 que fue aislado y caracterizado a partir de aguas residuales con las otras 10 especies de fagos seleccionados, para eso se procedió a comparar distintas características genéticas y morfológicas. Entre las características seleccionadas se tomó en cuenta la longitud del genoma del

bacteriófago, marcos de lectura, familia , características morfológicas como formas de cabeza y cola , porcentaje de G+C, estructura de su genoma y familia viral.

Para la construcción de un buen árbol filogenético es importante compararlo con un organismo que se taxonómicamente distante y con características que hayan sido bien descritas, por este motivo se escogió la secuencia del genoma completo del bacteriófago que ha sido más estudiado con capacidad de inhibir el crecimiento del grupo de las enterobacterias , el fago S9 con el objetivo de enraizar el árbol y mejorar el análisis de las evolución y relación filogenética. Los bacteriófagos seleccionados se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Bacteriófagos utilizados de la base de datos NCBI con su respectivo número de accesión.

BACTERIOFAGO	CÓDIGO NCBI	BACTERIOFAGO	CÓDIGO NCBI
A511	NC_009811.2	P100	DQ004855.1
P35	NC_009814.1	P70	NC_018831.1
B054	NC_009813.1	PSA	NC_003291.2
B025	NC_009812.1	A500	NC_009810.1
A118	NC_003216.1	P40	NC_011308.1
A006	NC_009815.1		

Elaborado por : El autor 2025

4.4. Alineamiento y análisis filogenético

Las once secuencias de genomas completos fueron alineadas y se realizó el análisis filogenético a través de la construcción de una cladograma. Para esto se utilizó el programa MEGA X , las secuencias descargadas se colocaron en un archivo en

formato fasta, debido a que son las condiciones en las cuales el programa admite y permite la ejecución, se procedió a realizar el alineamiento mediante el algoritmo Clustal W que se basa en realizar un alineamiento múltiple de las secuencias y desarrolla una matriz de distancia. Luego construye un árbol guía basado en los valores de la matriz. Finalmente, genera un alineamiento de consenso con la adición gradual de las secuencias según el árbol guía donde los pares de secuencias más cercanos (longitud de rama más pequeña en el árbol guía) se alinean primero y, por lo tanto, agrega gradualmente las siguientes secuencias (Ramu Chenna, 2003).

4.5. Anotación del genoma del bacteriófago p35

Es importante definir las características genéticas de cada ORF o gen que existe en la secuencia completa de ADN, para esto se realizó la anotación del genoma del bacteriófago p35 utilizando el programa DFAST en la cual genera todas las regiones que están dentro del genoma y además la posible proteína que se obtiene, esto con el afán de identificar cual es el gen que traduce a la proteína que le otorga la capacidad lítica al bacteriófago.

El análisis se inició obteniendo las secuencias genómicas completas de los bacteriófagos desde la base de datos pública NCBI, en formato FASTA, cada una de estas secuencias fue cargada al programa y se corrió el análisis de la anotación de cada uno de los genomas, los resultados arrojados por este programa permitieron analizar varias características genómicas importantes a considerar para evaluar y realizar el análisis comparativo con las secuencias de los otros bacteriófagos, la características que se tomó en cuenta fueron, tamaño del genoma(pb),porcentaje de GC, número de marcos de lectura y porcentaje de regiones codificantes. Después de la anotación del genoma se visualizan las características en el programa SNAPGENE

el cual detalla cada ORF anotado y se realiza un boceto de la estructura modular que sigue el genoma del bacteriófago.

4.6. Predicción de la traducción proteica

Una vez anotado el genoma del bacteriófago p35 , se procedió a realizar la predicción de los marcos de lectura(ORF) involucrados en la lisis celular, para esto con la anotación del genoma realizada en la herramienta DFAST , el genoma lo completo se subió en formato FASTA y se lo analizo, una vez realizada el proceso se evidencio todos los marcos de lectura que se encuentran en el genoma del bacteriófago, de éste proceso se obtuvo gana secuencia de nucleótidos de los genes y su correspondiente traducción a proteínas, se procedió a realizar la búsqueda de la función de cada proteína traducida a partir del ORF del bacteriófagos mediante la realización de BLAST y BLASTp con esto se procedió a organizar el genoma del bacteriófago p35 según sus marcos de lectura (ORF), por último se realizó la búsqueda de genes capaces de traducir a proteínas líticas como endolisinas.

5.Resultados

5.1. Características Genómicas

Se realizó la anotación de los genomas completos de los once bacteriófagos analizados, mediante la herramienta en línea DFAST, para realizar la comparación genómica se consideró ocho distintas características que diferencian a los bacteriófagos como se evidencia en la Tabla 2.

Entre las características se encuentran variables genómicas como; el tamaño del genoma, contenido de GC , la cantidad de marcos de lectura con capacidad de transcribir a proteínas (ORFs) y el porcentaje de regiones que son codificantes dentro de la estructura del genoma, también se tuvo en cuenta dos características morfológicas como el tamaño de la cola y cápside, la familia a la que taxonómicamente han sido descritos y una característica que es de suma importancia si el bacteriófago es capaz de producir la lisis de la lisis mediante su ciclo de replicación o no.

La mayoría de los bacteriófagos incluidos en este análisis pertenecen a la familia *Siphoviridae*, sin embargo, también se describen bacteriófagos de la familia *Myoviridae*, estas clasificaciones dependen de las características morfológicas

Tabla 2. Comparación de características genómicas de bacteriófagos para *Listeria*

Nombre	Familia	Tamaño Cápside (nm)	Tamaño Cola (nm)	Tamaño Genoma(pb)	Contenido GC (%)	Número de ORF	Regiones Codificante (%)	Virulencia
P35	<i>Siphoviridae</i>	58	110	35,822	40.8%	55	91%	Lítico
B054	<i>Myoviridae</i>	64	244	48,172	36.2%	76	94.6%	Lisogénico
B025	<i>Siphoviridae</i>	63	252	42,653	35.1%	63	91.6%	Lisogénico
A118	<i>Siphoviridae</i>	61	298	40,834	36.1%	65	92.9%	Lisogénico
P100	<i>Myoviridae</i>	90	198	131,384	36.0%	179	88.6%	Lítico
P70	<i>Siphoviridae</i>	57	141	67,170	36.5%	118	90.9%	Lítico
A511	<i>Myoviridae</i>	87	199	137,619	35.9%	193	88.0%	Lítico
PSA	<i>Siphoviridae</i>	61	180	37,618	34.7%	60	91.4%	Lisogénico
A500	<i>Siphoviridae</i>	62	274	38,867	36.7%	60	90.5%	Lisogénico
A006	<i>Siphoviridae</i>	62	280	38,124	35.5%	59	92.5%	Lisogénico
P40	<i>Siphoviridae</i>	56	108	35,638	39.3%	56	89.6%	Lítico

Elaborado por : El autor 2025, datos extraídos del programa DFAST

En la Tabla 2, se evidencia las diferentes características genómicas de los bacteriófagos estudiados entre estas características se pudo obtener los siguientes resultados:

- En cuanto a las familias y morfología, la mayoría de los bacteriófagos han sido descritos como pertenecientes principalmente a dos familias: *Siphoviridae* y *Myoviridae*.
- El tamaño del Genoma de los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* se evidencia que presentan genomas más largos entre ellos el fago p100 con un tamaño de genoma de 131,384 pb y el fago A511 con un tamaño de 137,619 pb, por su parte los bacteriófagos que fueron descritos como miembros de la familia *Siphoviridae* el tamaño de su genoma varía entre los 35,000 y 67,000 pb. El tamaño del genoma también se encuentra estrechamente relacionado con el número de marcos de lectura (ORF) y de las regiones codificantes de cada bacteriófago, los fagos con genomas más grandes, como A511 y P100, tienen un mayor número de ORF, 193 y 179 respectivamente esto se puede relacionar a que estos bacteriófagos presentan una mayor complejidad genética y una mayor diversidad funcional.
- El contenido de GC se encontró que es variable entre el bacteriófago PSA que presenta el menor porcentaje de 34,7% y el que tiene el mayor porcentaje correspondiente al 40,8 %.
- La virulencia es una de las características más importantes , ya que dependiendo del tipo de ciclo de vida del bacteriófago se podrían o no utilizar como una opción para fagoterapia, se identificaron distintos fagos líticos (P35, P100, P70, A511, P40), los cuales podrían ser prometedores para esta aplicación terapéutica sin embargo los fagos que tienen un ciclo de vida

lisogénico (A500, A006, PSA, A118, B054, B025), en cambio, integran su material genético en el genoma del hospedador, lo que podría limitar su uso terapéutico.

- El bacteriófago p35 que es el centro del estudio pertenece a la familia *Siphoviridae* con un tamaño de cápside de 58 nm y 110 nm de cola el tamaño total de su genoma está en 35,822 pares de bases y presenta 55 marcos de lectura que codifican para distintas proteínas, este bacteriófago conjuntamente con los bacteriófagos p40 , p70 y A511 son considerados líticos ya que dentro de su estructura genoma poseen regiones (ORF) que codifican para endolisina fágicas y otras proteínas que se encargan de realizar la lisis celular.

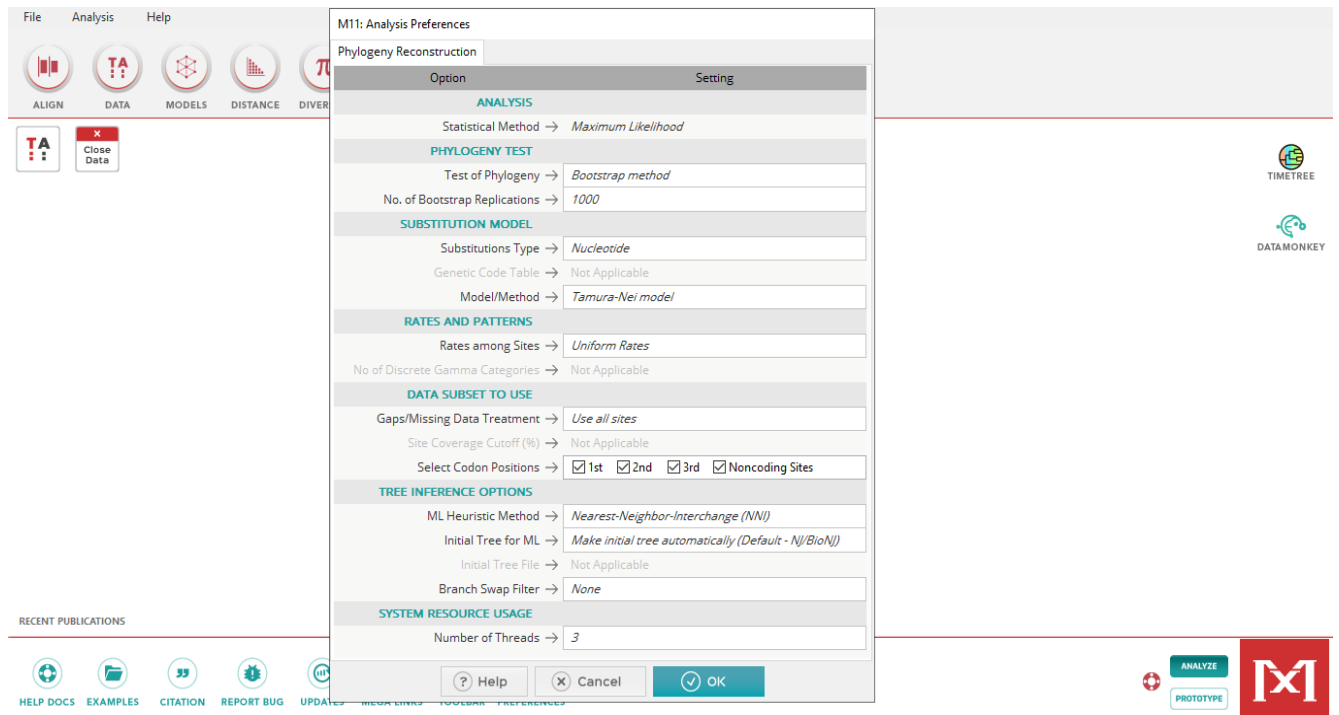
5.2. Árbol Filogenético

El árbol filogenético se generó utilizando el método de máxima verosimilitud con 1000 repeticiones de bootstrap, empleando el programa bioinformático MEGA X, como se evidencia en la figura 5.

A partir de un ancestro común se dividen en dos grupos Los bacteriófagos estudiados posteriormente se dividieron en siete clados los cuales se encuentran agrupados según la especie más cercana.

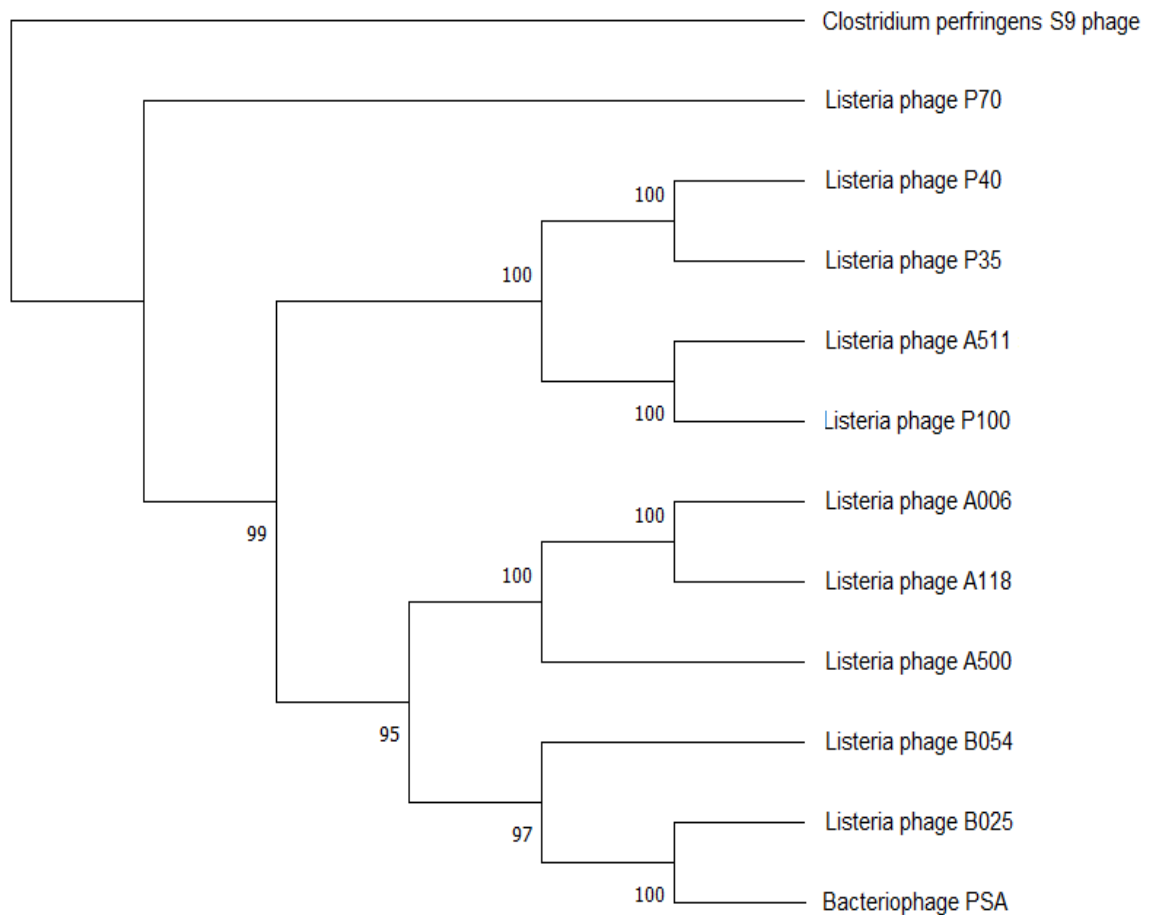
El árbol filogenético ilustra la trayectoria evolutiva de los bacteriófagos a partir de un ancestro compartido. La disposición de sus nodos permite inferir una cronología aproximada de su divergencia.

Figura 4. Metodología utilizada en la construcción del árbol filogenético en el programa MEGA X



Elaborado por : El autor 2025, extraído del programa MEGA X

Figura 5 Árbol Filogenético



Elaborado por: El autor 2025, creado en el programa MEGA X

El árbol filogenético ayuda a evidenciar la relación evolutiva que existe entre los bacteriófagos de *Listeria*, se obtuvo un árbol enraizado a través del método de máxima verosimilitud, como se puede ver en la figura 6.

En el árbol filogenético se pueden evidenciar tres clados conformados por distintos bacteriófagos de *Listeria* y el bacteriófago S9 de *Clostridium* es el bacteriófago que se encuentra como grupo externo lo que forma una rama evolutiva distante a los otros fagos de *Listeria*.

En el árbol se evidencian valores de bootstrap altos lo cual indica confianza en su relación evolutiva, el primer clado marcado se encuentran cuatro bacteriófagos de

Listeria los cuales son el fago p35, p40,A511 y p100 todos estos cuentan con un valor de bootstrap de 100 , el segundo con los fagos A006 y A118 los cuales de igual manera tienen un bootstrap de 100 y el tercero compuesto por los fagos B054, B025 y PSA con un bootstrap de 95, también en el árbol filogenético se puede determinar dos bacteriófagos más divergentes que se encuentran sin formar un grupo común con otros fagos, uno de estos y el que más separado evolutivamente se encuentra es el bacteriófago p70 lo cual nos indica que es uno de los bacteriófagos que ha emergido de una rama evolutiva distinta y no comparte características similares a los otras fagos y el bacteriófago A500 el cual se puede ver que se encuentra en una rama intermedia lo cual sugiere que comparte similitudes pero no se encuentra estrechamente relacionado.


5.3. Anotación genómica Bacteriófago p35

La anotación del genoma del bacteriófago p35 se realizó con el uso de la herramienta bioinformática DFAST, la cual permite comparar las características funcionales del genoma completo con diversas bases de datos. Este proceso incluye la identificación de genes y proteínas mediante la búsqueda de similitudes entre la secuencia del genoma analizado y secuencias previamente anotadas. DFAST facilita la detección de marcos de lectura abiertos (ORFs) y la predicción de regiones funcionales, proporcionando información clave para la anotación (Yasuhiro Tanizawa, 2017).

La Figura 7 representa los resultados derivados del análisis del genoma del bacteriófago p35, entre los cuales se destacan las siguientes características generales: el tamaño del genoma es de 35,822 pb, y el bacteriófago cuenta con 55

marcos de lectura abiertos, que corresponden a genes con la capacidad de traducir una proteína.

Figura 6. Anotación del genoma del bacteriófago p35 extraído del programa DFAST

Title : Bacteriofago p35 
 JobID : 2c177298-d50b-4056-9304-3530e0e98648
 Job Statu... COMPLETE

[2025-01-31 04:35:13.327444] Job submitted.
 [2025-01-31 04:35:13.431867] Job started.
 [2025-01-31 04:36:50.528205] Job completed.

Result Features Seq-names/Gene-IDs DDBJ Submission Quality Check Log

Genome Statistics

Total Length (bp)	35,822
No. of Sequences	1
GC Content (%)	40.8%
N50	35,822
Gap Ratio (%)	0.0%
No. of CDSs	55
No. of rRNA	0
No. of tRNA	0
No. of CRISPRS	0
Coding Ratio (%)	91.9%

Download Files

- Genbank Flat File : [annotation.gbk](#)
- GFF3-formatted File : [annotation.gff](#)
- Genome Fasta File : [genome.fna](#)
- Protein Fasta File : [protein.faa](#)
- CDS Fasta File : [cds.fna](#)
- RNA Fasta File : [rna.fna](#)
- Feature Table : [features.tsv](#)
- Pseudogene Summary : [pseudogene_summary.tsv](#)
- Genome Statistics : [statistics.txt](#)
- Zip Archive : [annotation.zip](#)

Extraído de : DFAST, <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>

Tabla 3. Predicción de funciones biológicas según los ORF del bacteriófago p35

ORF	FUNCION	ORF	FUNCION
1	proteína hipotética	29	proteína hipotética
2	PBSX Terminasa	30	Hidrolasa
3	proteína portal ensamblaje	31	proteína hipotética
4	proteína menor de la cabeza	32	proteína hipotética
5	proteína hipotética	33	DNA POLIMERASA
6	proteína mayor de la cabeza	34	DNA PRIMASA

7	proteína cabeza	35	proteína hipotética
8	Adaptador cabeza-cola	36	proteína hipotética
9	HK97 morfogénesis	37	proteína hipotética
10	proteína cabeza	38	QUINASA
11	proteína mayor de la cola	39	proteína hipotética
12	proteína hipotética	40	proteína hipotética
13	peptide methionine sulfoxide reductase	41	Endonucleasa
14	proteína de la cola	42	proteína hipotética
15	proteína menor de la cola	43	proteína hipotética
16	proteína de la cola	44	proteína hipotética
17	proteína de la cola	45	DNA BINDING PROTEIN
18	holina	46	proteína hipotética
19	proteína hipotética	47	proteína hipotética
20	proteína hipotética	48	proteína hipotética
21	proteína hipotética	49	proteína hipotética
22	proteína hipotética	50	proteína hipotética
23	LPXTG anclaje a la pared celular	51	proteína hipotética
24	proteína hipotética	52	proteína hipotética
25	endonucleasa	53	proteína hipotética

26	proteína hipotética	54	proteína hipotética
27	proteína hipotética	55	proteína hipotética
28	Endolisina		

Elaborado por: El autor 2025, extraído del programa DFAST

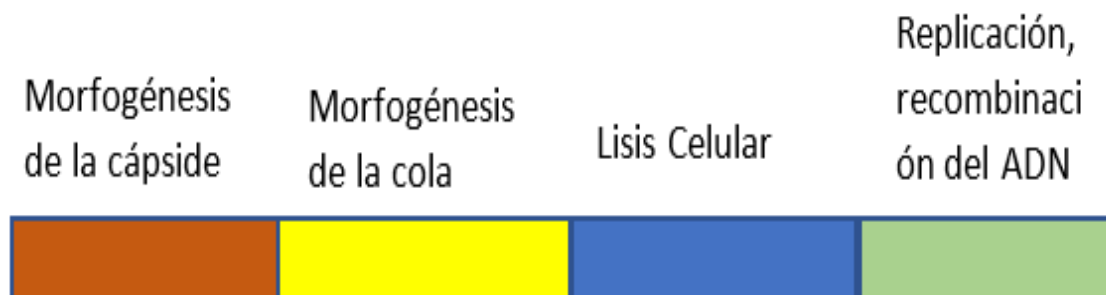
El análisis del genoma del bacteriófago P35 reveló que pertenece a la familia Siphoviridae, una clasificación respaldada por la correspondencia entre su estructura morfológica y genómica con las características definitorias de dicha familia.

En la tabla 3, se detalla los hallazgos generados después de la anotación funcional de los genes, se describen ORF involucrados en la morfogénesis de la cápside (ORFs 2,3,4,6,7,8,9,10), en la estructura de la cola (ORFs 11,14,15,16,17), las proteínas involucradas en la lisis celular (ORFs 18,23,25,28) y los involucrados en la replicación y recombinación del ADN (ORFs 33,34,38,41,45).

Se observa una disposición del genoma del bacteriófago donde se disponen de cuatro módulos funcionales que cumplen con un orden característico como se puede ver en la figura 9. Dentro de estos módulos se identificaron tanto genes con funciones conocidas y conservadas, como extensas regiones genéticas cuya función aún se desconoce.

Sin embargo, también después de la anotación funcional del genoma se describen genes con funciones conocidas para la morfogénesis de la cápside y de la cola del bacteriófago, región con genes que codifican proteínas involucradas en el ciclo lítico del fago y por último una región implicada en la replicación y recombinación del ADN.

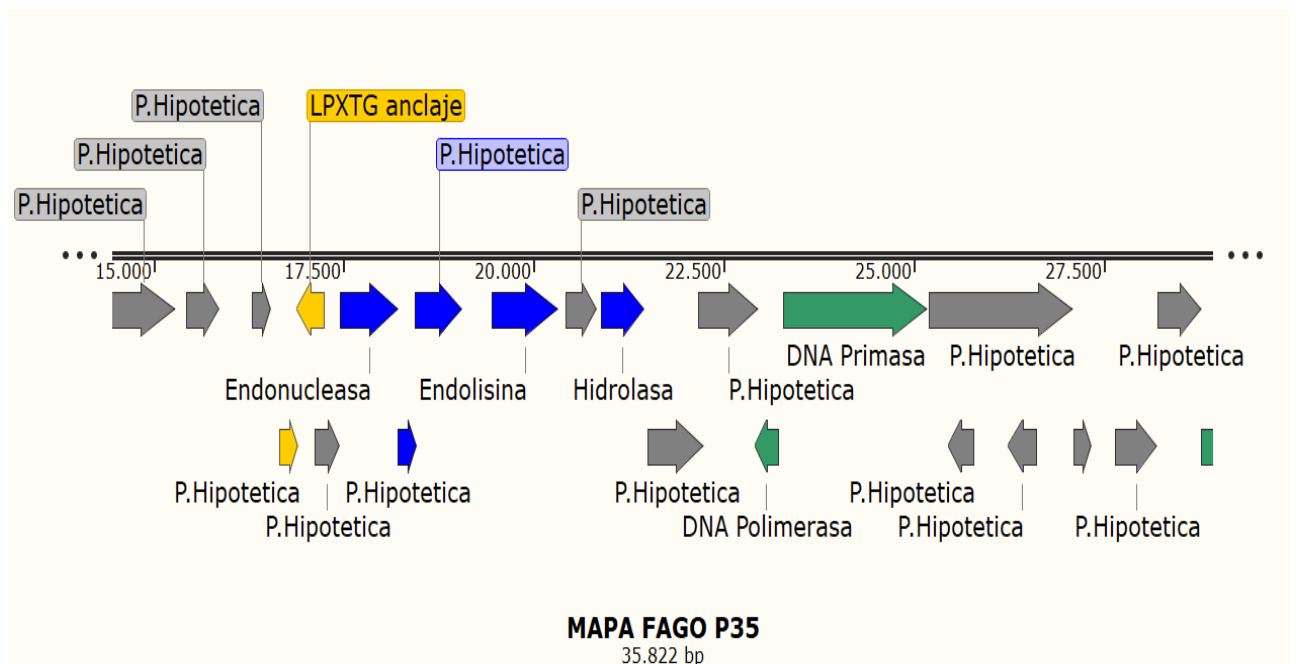
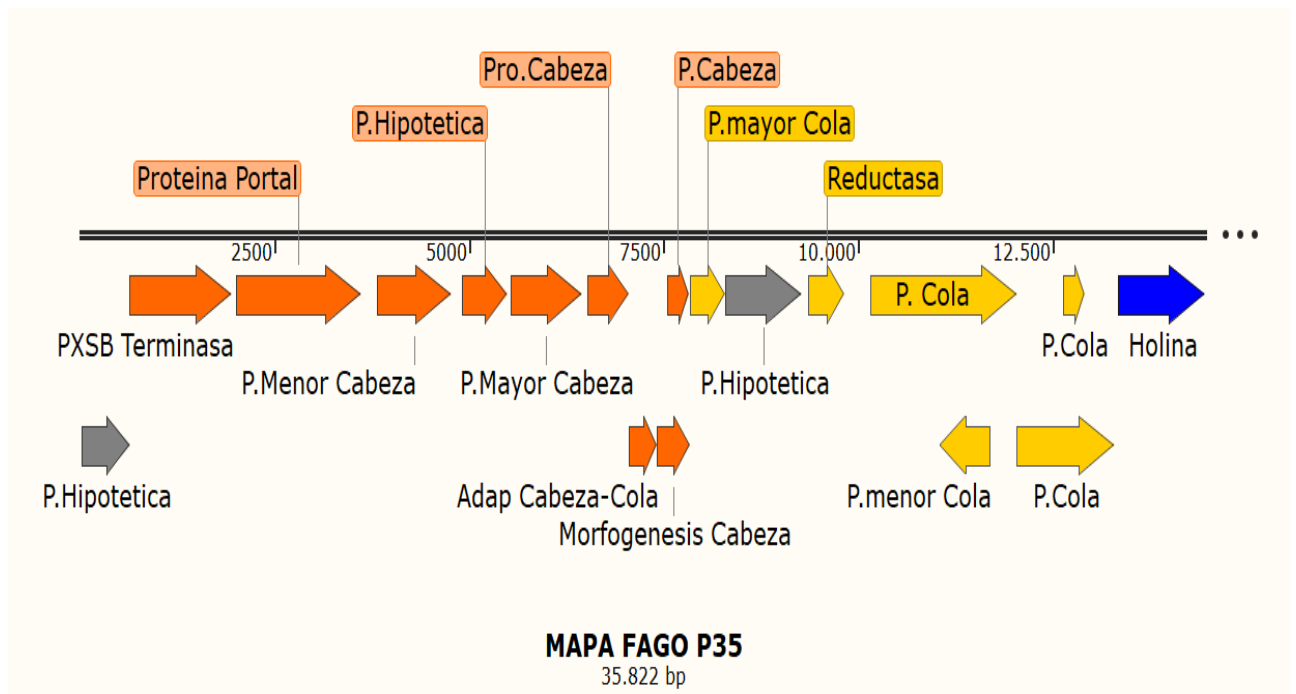
Figura 7. Estructura modular del genoma del bacteriófago p35

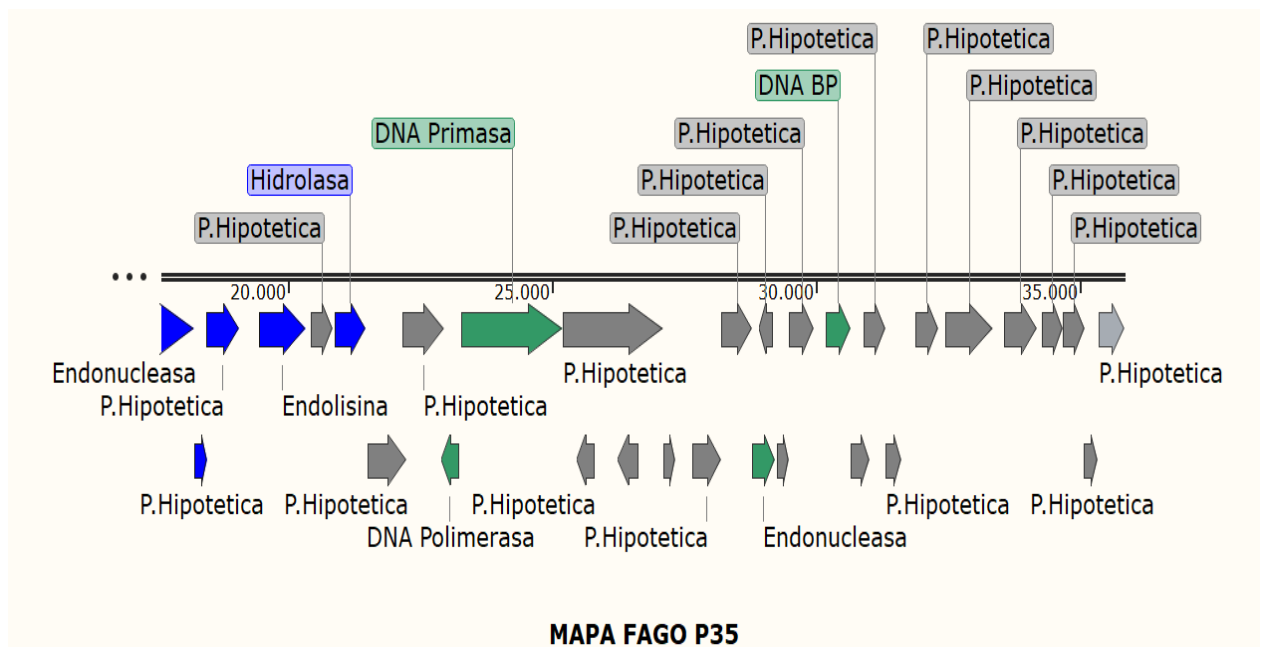


Elaborado por: El autor 2025

En la figura 10 se evidencia el mapa genómico construido a partir de la anotación funcional del genoma del bacteriófago p35, en este mapa se pueden observar que la mayoría de los genes son transcritos de izquierda a derecha, sin embargo, existen genes que codifican de derecha a izquierda, como el ORF 15 de una proteína estructural de la cola, también el ORF 23 que codifica para la proteína LPTXG involucrada en el anclaje del bacteriófago y también el ORF 33 correspondiente a la ADN polimerasa.

Figura 8 . Mapa genómico del bacteriófago p35, extraído del programa SnapGene Viewer, módulo de cápside en color naranja, módulo de lisis en color azul, módulo de cola en color amarillo y módulo de recombinación de ADN en color verde, proteínas hipotéticas en color verde, proteínas hipotéticas en color gris.





Elaborado por: El autor 2025

Cada uno de los genes descritos en el mapa genómico, según los módulos que fueron detallados anteriormente se describen a continuación.

Morfogénesis de cápside (ORFs 2,3,4,6,7,8,9,10): los genes que se encuentran involucrados en la estructura de la cápside del bacteriófago se encuentran traducidos a partir de los genes u ORFs 2,3,4,6,7,8,9 y 10 del fago p35 entre los genes pertenecientes a este módulo se encuentran, los de la subunidad pequeña y grande de la terminasa (ORF 2) y genes estructurales de la cápside como la proteína portal (ORF 3) la cual está involucrada directamente en el ensamblaje de la cápside. La actividad de activador de la transcripción tanto de la proteína RinA como RinB fue demostrado, que modula la expresión del gen de la integrasa (Ye and Lee 1993). La proteína de la cola y la cabeza mayor son las proteínas más abundantes en los viriones maduros (Moyano,2019).

Morfogénesis de cola (ORFs 11,14,15,16,17,23): estos genes se encuentran involucrados en la codificación de diferentes proteínas estructurales de la cola del bacteriófagos, entres estas se encuentran proteínas menores de la cola ORF 13 y también la proteína involucrada en el anclaje a la pared celular LPXTG en el ORF 23.

Lisis (ORF 18,28): son los genes responsables de codificar para las p del bacteriófago p35 son los 18 y 28 correspondientes a dos proteínas líticas Holina y endolisina respectivamente las cuales cumplen con la función de generar la lisis de la célula bacteria hospedera.

Las holinas constituyen un conjunto variado de proteínas pequeñas con diversas funciones, las cuales provocan la lisis de la célula hospedadora en un tiempo específico que ha sido programado genéticamente. También son proteínas con una o más actividades muralítica, es decir, provocan la ruptura de la pared celular. (Sass and Bierbaum 2007). Las endolisinas, también conocidas como “enzimas líticas de fagos”, son hidrolasas de mureína codificadas por los bacteriófagos en la etapa final del ciclo de infección (Gerstmans, Criel & Briers, 2018).

Recombinación y replicación del ADN del bacteriófago (ORF 33,34,45): el último módulo que se logró identificar en el genoma del fago p35 , es el que se encuentran los genes involucrados con la replicación del ADN del virus, identificando enzimas importantes en la replicación como la ADN polimerasa y primasa, también se determina que algunos o varios de los genes de este módulo pueden estar involucrados con cambios metabólicos en el ADN del organismo hospedador que es

necesario para que se lleve a cabo la replicación del ADN fágico. (Christie and Dokland 2012; Novick, Christie, and Penadés 2010).

5.4. Anotación funcional proteínas líticas del Bacteriófago p35

El bacteriófago p35 presenta en su genoma, dos enzimas que son las encargadas de la lisis celular, estas proteínas son las que permiten al bacteriófago cumplir su ciclo de vida lítico, la primera de estas corresponde a una Holina y como se puede ver en el mapa genómico (Figura 9) se encuentra ubicada en el marco de lectura (ORF) número 18 de la secuencia, específicamente en el LOCUS 180 que comprende entre las 15427 y 15876 pares de bases de la secuencia de ADN, comprendiendo un fragmento de 449 pb, dicha secuencia traduce para una proteína Holina que es importante en ciclo lítico del bacteriófago, la secuencia de este marco de lectura se puede ver en la Figura 11.

Figura 9.Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 18 (HOLINA), extraído de DFAST

The image shows a screenshot of a DFAST tool interface. It is divided into two main sections: 'Nucleotide' and 'Translation'. The 'Nucleotide' section contains a long string of DNA sequence characters (A, T, G, C) arranged in 15 lines. The 'Translation' section contains the corresponding amino acid sequence in single-letter codes, also arranged in 15 lines. Below the translation, there is a link 'Blast this sequence at NCBI.' and a 'BLAST' button.

```
Nucleotide
ATGGAGCTGAACAAATTGTTAATTGACGGAGCTAATGCGCTGGTTCATA
ATCAGTTTTTTTTATTTGCTAGTAGGAGTTATTACATTTGATTATATTACTGG
TGTTTTAAAAGCCATCATATGGAAGGTAGCGGACTCAAGTACTGGTTTC
AAGGGTCTAACTAAACACACGCTAGTTATTGCATTGTTCGCACTCGGGT
ACTTGTGGCTGACACGTATAACTTTGCTAATGTGGTAACAGTGATTTTA
TTCTGGTATGTGTTGAACTACGGACTATCTATTTTAGAAAACTTTGGTGT
GATGGGTATTCTTGTCCCCCATTCTAGTGACTCGAATTAAGCAGAG
ATTAAGAAATACGAATCACAAGTGGGCGAACAGGGGTTGGAGTCACGC
GCACACAAGCTATCTGATAAGGTCACAAGTCAAATTGACCCGTCAGCG
GAATAA

Translation
MELNKLIDGANALVHNQFFYLLVGVITFDYITGVLKAIWQVADSSTGFKGL
TKHTLVIALFALGYLFADTYNFANVVTVILFWYVLNYGLSILENFGVMGILVP
PFLVTRIKAEIKKYESQVGEQGLSRAHKLSDKVTSEIDPSAE

Blast this sequence at NCBI. BLAST
```

Extraído de : DFAST 2025

Asimismo, en el ORF 28 es otro de los marcos de lectura que se identificó el cual está involucrado en el ciclo lítico del fago a través de la proteína que más interviene en la lisis celular la cual es la Endolisina fágica este ORF se encuentra entre los 19450 y 20325 pares de bases de la secuencia del genoma del bacteriófago con un tamaño de 875 pb la secuencia de ADN y posteriormente traducida a aminoácidos se puede ver en la figura 12.

Figura 10. Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 28 (ENDOLISINA), extraído de DFAST

```
Nucleotide
ATGGCACGAAAATTTACAAAAGCTGAACTGGTAGCTAAAGCAGAAAAG
AAAGTCGGTGGATTAAAACCCGACGTAAGAAAGCAGTATTGTCCGCA
GTGAAGGAAGCATATGACCGCTATGGTATTGGGATTATCGTATCACAGG
GTTATCGTTCAATTGCTGAACAAAACGGATTGTATGCACAAGGTCGGAC
CAAACCGGGGAACATTGTGACCAACGCAAAAGGTGGACAATCTAACCA
TAACTTTGGTGTGGCGTTGACTTTGCTATTGACTTGATTGACGATGGT
AAAATCGACTCTTGGCAACCATCAGCAACCATTGTGAACATGATGAAAC
GTCGTGGGTTCAAATGGGGCGGAGATTGGAAAAGCTTTACTGACCTTC
CACATTTTGAAGCTTGTGACTGGTATCGCGGGGAACGCAAGTATAAAG
TGGACACATCTGAATGGAAAAAGAAAAGAGAATATCAATATCGTTATAAA
GATGTTGGTTACTTCCAAGACAAACCTCAATTCTTAAACTCCAAATCGG
TTCGTCAGTGGAAAGCATGGCACGAAAGTGAAGCTTACTAAACATAACT
CACATTGGTACACTGGTGTGGTCAAGGATGGTAACAAATCAGTCAGGG
GATATATTTATCATTTCGATGGCTAAGGTCACAAGCAAGAATAGCGACGG
TTCGGTTAACGCAACGATTAACGCCACGCATTTTGTGGGACAATAAA
AACTTAATGGTGGCGACTTTATCAACTTGAAGCGTGGTTTTAAAGGTA
TCACCCATCCCGCTAGTGACGGTTTCTATCCACTGTATTCGCTTCTAG
GAAAAAACTTTCTACATTCCGCGTTACATGTTTGACATCAAGAAATGA

Translation
MARKFTKAELVAKAEKKVGGGLKPDVKKAVLSAVKEAYDRYGIGIIVSQGYR
SIAEQNGLYAQGRTPKPGNIVTNAKGGQSNHNFGVAVDFAIDLIDDGKIDSW
QPSATIVNMMKRRGFKWGGDWKSFTDLPHFACDWYRGERKYKVDTSE
WKKKENINIVIKDVGYFQDKPQFLNSKSVRQWKHGTVKVLTKHNSHWYT
GVVKDGNKSVRGIYHSMKVTSKNSDGSVNATINAHAFCDWNKKLNGG
DFINLKRGFKGITHPASDGFYPLYFASRKKTFYIPRYMFDIKK
```

Extraído de : DFAST 2025

La última proteína que se encontró después de la anotación del genoma del bacteriófago p35 fue la Hidrolasa, la cual es codificada a partir del ORF 30 del genoma del fago y está comprendida entre los 20914 y 21456 pares de bases con un tamaño de 542 pb, la secuencia de ADN y posteriormente la secuencia traducida se puede ver en la Figura 13.

Figura 11. Secuencia de nucleótidos y traducción ORF 30

(ENDONUCLEASA), extraído de DFAST

Nucleotide
ATGAAAGAAGACTTGTACGAGTGTGATTACTTG TTCCTGACCCATCGTC ACACTGACCACTTCAAACCATCGACATATAAAATGATACGGAAGTTTTTC CCGAATATTATCGTATGCGGTGGTCCTGATATGTT CAGACTCGCGAATAT GGATT CAGATAAAGACATTGTGACCGTAGCAGGTGATTTTATCAACTTA GAACACTTCACCAACGTA ACTGTTTTTGACGCTGTACACGACGTT CCTA CTCAAGGTTTTGTATTTCACTTCGACGATGGTACGTATAACATTATCTAC TGC ACTGACACAAGCACATTGGAGAATGCACCAGATATGAAGTATAATG AGTTTTTTCATCGAAGCCAATTACGACAAGAAGAACTAGACGCGATTGC TAATAGTAAGCACGAGATTAAGTATGATTTTGT CCGTGGTGCTAGTCGT CATTTGAGTAAACAGGACAGCAAGAAGTTTTATTATCTACACAGAGAAA ATAAAGATTGCCCTATCACCCGCTACATCAGTCGAGTAGATTTTACTAA
Translation
MKEDLYECDYLFLTHRHTDHF KPSTYKMIRKFFPNIIVCGGPDMFRLANM DSDKDIVTVAGDFINLEHFTNVTVFDAVHDVPTQGFV FHFDDGTYNIIYCT DTSTLENAPDMKYNEFFIEANYDKKKLDAIANSKHEIKYDFVGGASRHLSK QDSKKFY L HRENKDCPYHPLHQSSRFY

Extraído de : DFAST 2025

6. Análisis de resultados

El avance en las herramientas bioinformáticas, acompañada con el creciente progreso en estudios sobre el aislamiento y caracterización de bacteriófagos, ha permitido facilitar la comprensión y la recopilación de un volumen significativo de datos relativos a su genética y sus relaciones evolutivas. Además, estos estudios han impulsado el desarrollo de la fagoterapia como una estrategia prometedora en la lucha contra la resistencia antimicrobiana (RAM), lo que proporciona opciones terapéuticas eficaces para combatir infecciones originadas por bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos tradicionales.

Las bacterias del género *Listeria* spp., tienen la capacidad de colonizar y ser transmitidas a los humanos a través de la contaminación cruzada con alimentos de consumo diario, estas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir y desarrollarse en múltiples ambientes como, el intestino de animales, agua, suelo, superficies, paredes, techos, plantas y han sido también aisladas de productos terminados que están listos para el consumo esto se debe a la capacidad que tienen de resistir temperaturas de refrigeración (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2006).

Al causar enfermedades significativas y presentar mecanismos de resistencia a los antibióticos, esta situación constituye un riesgo para la salud pública.

Es por esto por lo que el estudio de los bacteriófagos con capacidad de infectar y provocar la muerte de la célula bacteriana y la comprensión de su genoma es importante ya que nos permite aportar información para comprender los distintos

mecanismos de transferencia de genes y también nos permite identificar la presencia de enzimas como endolisinas como posibles agentes de biocontrol.

Esta tesis contribuyó a la comprensión de las relaciones filogenéticas, la anotación funcional de genes y el análisis de genómica comparativa entre diversas especies de bacteriófagos del género *Listeria* y el bacteriófago P35, proporcionando información clave para su caracterización y potencial aplicación en fagoterapia.

6.1. Características genómicas

Las características estudiadas fueron determinadas a partir de la anotación funcional de los genomas de los bacteriófagos, sin embargo, también se recopiló información importante relacionada con sus características morfológicas mediante las cuales se determina la clasificación taxonómica de los bacteriófagos, lo que determina que los bacteriófagos pertenecientes principalmente a dos familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* los cuales son representados principalmente por las características morfológicas de sus colas. Los *Siphoviridae* por su parte presentan colas largas y no contráctiles mientras que la familia *Myoviridae* poseen colas contráctiles. (Loessner, 2013).

Las distintas características genéticas como el tamaño del genoma, número de marcos de lectura (ORFs) , contenido de GC fueron obtenidas mediante la anotación con la herramienta bioinformática DFAST, los tamaños del genoma de los fagos estudiados fueron variables, presentando genomas variables, los bacteriófagos que mayor tamaño de genomas tienen son los fago A511 y p100 que presentan un tamaño de 137,619 y 131,384 respectivamente, esto nos indica que estos dos bacteriófagos presentan una similitud muy grande en sus genomas, en cuanto al número de marcos de lectura P100 pose 179 ORFs y A511 193, esto también sugiere que son

morfológicamente indistinguibles, lo que también se refleja en una organización genómica muy similar y fuertes homologías de secuencia entre las proteínas estructurales (Loessner, 2013).

En cuanto a los otros bacteriófagos presentan un tamaño de genoma variable que van entre 35,000 y 67,000 pb, los fagos de la familia *Siphoviridae* el tamaño del genoma más pequeño corresponde al fago p40 con (35,638), seguido del P35 (35,822), el PSA (37,618), el A006 (38,124), el A500 (38,867), el A118 (40,834) y el B025(42,653),(Dorscht,2009).

En cuanto a los bacteriófagos de la familia *Myoviridae* el bacteriófago que menor tamaño del genoma tiene a comparación de p100 y A511, es el fago B054 con un tamaño de 48,172, (Dorscht,2009).

El bacteriófago p35 que fue el principal enfoque de este estudio se determina que pertenece a la familia *Siphoviridae* y que posee una cantidad de 55 ORFs involucrados en la síntesis de distintas proteínas necesarias para cumplir sus características morfológicas y así como también que se encuentran en la síntesis de proteínas involucradas en su ciclo de vida lítico y las cuales son las responsables de ocasionar la muerte la bacteria que infecta.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Klumpp y colaboradores en 2013 donde menciona que los genomas de bacteriófagos de *Listeria* están compuestos de ADN y están organizados de forma modular, generalmente con un módulo que codifica proteínas estructurales, un módulo de genes tempranos que codifica funciones para la recombinación, replicación y reparación del ADN, un casete de lisis con un gen de holina y uno de endolisina y, en el caso de los fagos templados,

una región de control de la lisogenia, esto se evidencia en la organización que se dio al bacteriófago p35 después del mapeo y anotación de su genoma (Klumpp J, 2013)

6.2. Árbol Filogenético

El árbol filogenético construido permitió entender la relación evolutiva que existen entre los bacteriófagos de *Listeria*, se obtuvieron diferentes grupos evolutivos o clados los cuales nos indican tres distintos grupos que representan un ancestro en común del cual se derivan los diferentes bacteriófagos de *Listeria*. Los bacteriófagos A511 Y p100 son similares por lo cual se encuentran dentro del mismo grupo, así como también los p35 y p40, sin embargo, el bacteriófago p70 se encuentra solo en un grupo lo que quiere decir que genética y morfológicamente este fago no comparte características comunes con los otros, esta agrupación tiene un porcentaje de bootstrap de 100 lo cual indica que estos fagos compartieron un ancestro común más reciente

Los fagos p35 y p40 están un ciclo lítico por lo cual tiene una descendencia evolutiva que les ha permitido desarrollar la característica de provocar la lisis en la célula hospedera (Dorscht,2009). La cercanía entre P35 y P40 sugiere que son los más relacionados y podrían haber divergido en tiempos relativamente recientes, posiblemente debido a adaptaciones a cepas específicas de *Listeria monocytogenes*.

El bacteriófago p70 es el que más tempranamente se separa y diferencia de los demás fagos formando una rama, esto sugiere que P70 podría haber retenido características más primitivas o haber evolucionado hacia un nicho ecológico distinto, esto se debe a que P70 posee un genoma único, aproximadamente un 50 % más

grande que otros fagos de *Listeria* y la mitad del tamaño de los genomas de fagos de *Listeria* más grandes conocidos, el genoma se divide en varios módulos funcionales que corresponden al estilo de vida, pero presenta una naturaleza altamente mosaica y está compuesto por más módulos que cualquier otro genoma de fagos de *Listeria* conocido (Martina M. Schmuki, 2012).

El fago PSA se encuentra en una posición basal dentro del grupo de *Listeria*, lo que indica que podría representar una línea más primitiva dentro de estos fagos o un linaje que divergió antes de la gran diversificación de los otros fagos de *Listeria*.

En el segundo grupo que se divide a partir del ancestro en común se encuentran 5 clados conformados por los bacteriófagos A006 y A118 , A500 , B054, B025 Y PSA una característica que tienen todos estos fagos es que tiene un ciclo de vida lisogénico por lo cual a partir de su ancestro común evolucionaron para que su replicación dentro de la célula hospedera tenga esta característica. Por otra parte, y como se mencionó anteriormente se tienen que existen bacteriófagos con cercanía evolutiva como lo son el A006 con el A118 y el B025 con el PSA , sin embargo, el bacteriófago A500 y el B054 no se encuentran agrupados con otros bacteriófagos.

6.3. Anotación genómica Bacteriófago p35

La anotación genómica del bacteriófago p35 fue realizada mediante tres programas bioinformáticos, el primero de esto fue mediante DFAST el cual permite de una manera directa subir la secuencia completa del genoma, BLASTp que permitió identificar mediante la secuencia de la proteína la clasificación de esta y por último se utilizó SNAPGENE para realizar el mapa del genoma del fago.

La predicción bioinformática de genes mediante la anotación funcional permitió identificar la cantidad de genes (ORFs) presentes en el genoma del bacteriófago p35 los cuales fueron descritos en la tabla 2, dicho fago posee 55 marcos de lectura abiertos que codifican para distintas proteínas involucradas en cuatro principales funciones , las cuales fueron organizadas en cuatro módulos, esto concuerda con un estudio donde se realizó la anotación y descripción de distintos bacteriófagos líticos para listeria spp, donde identificaron que el fago p35 posee las misma cantidad de genes (ORFs) que fueron descritos en este estudio, también en general, la bioinformática reveló una organización de los genomas en módulos funcionales (Julia Dorscht, 2009), que siguen una orden definido, como se puede ver en la figura 9 , en la anotación de cada secuencia de genes que arrojó BLASTp se identificó que se encuentra distribuido primeramente por un módulo donde se traducen proteínas involucradas en la morfogénesis de la cápside, de la cola, genes necesarios para el ciclo de vida lítico del bacteriófago, para la replicación y recombinación del ADN viral.

Las proteínas clave para la posible aplicación como agente de biocontrol del bacteriófago p35 son las que se encuentran codificadas por el tercer módulo de la organización del genoma del fago y son las que tiene la capacidad de generar la ruptura de la estructura celular de la bacteria huésped las principales proteínas que son codificadas por el fago p35 son dos , la primera de esta codificada a través del ORF número 18 del genoma del fago, correspondiente a una Holina que son proteínas pequeñas que forman poros en la membrana celular de los huéspedes, lo que permite que las enzimas lisinas degradan la pared celular bacteriana. Son codificadas por los bacteriófagos y se insertan en la membrana citoplasmática (RF Young III, 2008).

La función principal de la proteína holina en el proceso de lisis celular es que es la encargada de liberar la endolisina en el periplasma y actúa como el "reloj de lisis". Este mecanismo de reloj implica que las holinas regulan el inicio de la lisis, lo que determina así la duración de la fase vegetativa. Se han identificado homólogos de la holina en los tres dominios de la vida, con más de 60,000 entradas únicas registradas en la base de datos de proteínas idénticas del NIH (RF Young III, 2008).

Por otra parte, la anotación funcional del genoma del bacteriófago p35 permitió también identificar otra proteína que forma parte de la actividad lítica del bacteriófago y siendo la enzima con más relevancia, está codificada por el ORF 28 y es descrita como una endolisina fágica.

Las endolisinas son hidrolasas de mureína codificadas por los bacteriófagos en la etapa final del ciclo de infección (Gerstmans, Criel & Briers, 2018). Cumplen la función específica de debilitar la pared celular bacteriana a través de la hidrólisis del peptidoglicano con el objetivo de liberar la progenie viral, lo que provoca la muerte celular (Fischetti, 2005; Zhang, Karra & Gorski, 2014). Por lo tanto, en el bacteriófago p35 se determinó que estas proteínas son las que hacen que dicho fago ocasiona la lisis celular de las bacterias a las que infecta lo que permite comprobar la actividad que fue descrita con métodos bacteriológicos donde se evidenció que el fago ocasiona calvas de lisis e inhibe el crecimiento de las bacterias del género *Listeria* spp.

En este estudio se describió la secuencia de holina cuyo número de accesoión en el NCBI es YP_001468802.1. Esta proteína forma parte del genoma del bacteriófago p35 el cual es el centro del estudio por lo cual se puede comprobar que este

bacteriófago cumple con un ciclo lítico y permitiría actuar como un agente de biocontrol para bacterias.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1. Conclusiones

Se realizó un análisis genómico comparativo de genomas completos de bacteriófagos descritos específicamente para utilizar la maquinaria de las células bacteriana de *Listeria spp*, también ha permitido identificar cuales de estos fagos son capaces de desarrollar dentro de su genoma genes que les permita tener un ciclo de vida lítico y por lo tanto puedan inhibir el crecimiento de las bacterias a las que atacan, esta identificación mediante herramientas bioinformáticas permitio destacara su potencial como agentes de biocontrol para cepas de *Listeria spp*, con resistencia a los antimicrobianos.

Fueron identificados mediante la anotación genómica del bacteriofago p35 genes asociados a funciones específicas y esenciales para que dicho fago cumpla con un ciclo lítico, lo que identifica mediante un mapa genómico la descripción de los genes, orden y clasificación de dos proteínas las cuales son las principales producidas por este fago y que se pueden considerar como posibles marcadores moleculares para comprobar que dicho bacteriófago estudiado podría ser utilizado en fagoterapia o como un agente de biocontrol, también esto ha permitido comprender de mejor manera la forma en la cual este bacteriofago cumplen con una organización especifica de su genoma para cuatro características principales como las proteínas de su cápside, cola , las involucradas en su ciclo de replicación de ADN y las proteínas en su ciclo de vida lítico.

Los resultados obtenidos también permitieron comprender como ciertos fagos poseen ventajas comparativas en términos de especificidad, estabilidad genética y ausencia de genes relacionados con la lisogenia, lo que respalda su viabilidad como alternativa a los antibióticos tradicionales o a métodos convencionales de descontaminación.

Asimismo, el análisis bioinformático realizado resalta la importancia de las herramientas de genómica comparativa para la selección racional de bacteriófagos, permitiendo una evaluación más precisa de sus características funcionales y de seguridad. Esta aproximación contribuye a fortalecer la base científica para el desarrollo de terapias fágicas o estrategias de biocontrol, especialmente frente a patógenos de relevancia alimentaria como *Listeria monocytogenes*.

El análisis filogenético permitió establecer relaciones evolutivas de los bacteriófagos de *Listeria* spp aportando información clave sobre su diversidad genómica y potencial funcional se identificaron distintos clados o grupos de fagos que comparten características genómicas similares, el bacteriofago p35 comparte relaciones evolutivas con otro bacteriofago lítico como es el p40 esto se pudo comprobar también mediante la anotación funcional y genómica lo cual permite concluir que dicho bacteriófagos pueden ser considerados una opción potencial para fagoterapia y control de bacterias resistentes a los antibióticos. También permitió comprender la naturaleza evolutiva que comparten otros bacteriófagos los cuales siguen un ciclo de vida lisogénico y no pueden ser considerados como una opción para fagoterapia. Es por esto por lo que esta investigación ayuda a realizar una indagación de los fagos a considerar como agentes de biocontrol.

Al identificar genes líticos y establecer relaciones filogenéticas, esta investigación contribuirá a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la infección por bacteriófagos y a la selección de candidatos prometedores para el desarrollo de fagoterapias.

Esta investigación sienta un precedente para futuras investigaciones orientadas al diseño de cócteles fágicos personalizados, así como al estudio de las interacciones entre fagos y bacterias en entornos específicos, promoviendo un enfoque biotecnológico sustentable y eficaz en el control microbiano.

7.2. Recomendaciones

Se recomienda que es importante ampliar los análisis de caracterización de otros bacteriófagos que tengan una actividad lítica contra bacterias que ocasionan importantes problemas de salud pública y sobre todo a cepas multirresistentes a los antibióticos, también es importante ampliar los análisis de genomas de fagos ya descritos , ya que esto puede ahorrar muchos pasos al momento de la elección de un bacteriófago lítico con posibles aplicaciones como agente de biocontrol o en fagoterapia.

Este estudio también permitió dejar una base para comprender las acciones evolutivas de los bacteriófagos por lo cual se recomienda ampliar este análisis a bacteriófagos aislados para otras familias y clases de bacterias que son patogénicas.

8. Referencias

- Ackermann, H. W. (2000). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843–857. <https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Bin Jang, H., Bolduc, B., Zablocki, O., et al. (2019). Taxonomic assignment of uncultivated prokaryotic virus genomes is enabled by gene-sharing networks. *Nature Biotechnology*, 37(6), 632–639.
- Carter, J., & Saunders, V. (2007). *Virology: Principles and Applications*. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=EKRgZCdr74C&oi=fnd&pg=PR15&dq=Virology:+principles+and+applications.&ots=ty5tA9uHU3&sig=Mjbo_wD6jVy0vVZQb1QwgUStxA#v=onepage&q=ADN o ARN&f=false
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., et al. (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications*, 5, 4498.
- Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).
- Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., & García, P. (2020). Los bacteriófagos. Los virus que combaten infecciones. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=pPjrDwAAQBAJ&pg=PT25&dq=bacteri%00fagos&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwiorYHK8ITrAhURVN8KHdTIBegQ6wEwAHoEC AUQAQ#v=onepage&q&f=false>

- Forey P.L. 1992. Formal classification . En : Forey P.L., Humpries C.J., Kitching I.J., Scotland R.W., Siebert DJ. y Williams D.W. Edrs. Cladistics. A practica[course in systematics. Oxford, Claredon Press, 124-136.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2006). Listeria monocytogenes. Elika.
- Granda G, Quilachamin T.(2021). AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE Listeria spp CON RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.Quito.Ecuador.
- Granda G-J, Enríquez WJ, Quilachamin TJ, Ronny RA, Debut A, Karolys GM, Angamarca Iguago J, Simancas Racines A, Torres Arias M, León-Sosa A, Villavicencio FX. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos y su impacto en la reducción de colonias de Listeria spp. resistentes a los antibióticos. PFR [Internet]. 23 de noviembre de 2023 [citado 16 de abril de 2025];8(3). Disponible en: <https://practicafamiliarrural.org/index.php/pfr/article/view/294>
- Gerstmans, H., Criel, B. & Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. Biotechnology Advances, 36(3), 624-640. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009
- Gerstmans, H., Criel, B. & Briers, Y. (2018). Synthetic biology of modular endolysins. Biotechnology Advances, 36(3), 624-640. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009
- Loessner, J. K. (2013). Listeria phages Genomes, evolution, and applicatio. Bacteriophage, 8.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos (14 a edición). España.

- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). Brock. Biología de los microorganismos (14 a edición). España.
- Moyano, S. R. (2019). Bioinformática aplicada a la caracterización genómica y clasificación de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional de Rosario, 72.
- RF Young III, R. W. (2008). Enciclopedia de Virología Tercera edición. Elsevier.
- Rohwer, F., & Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4529–4535.
- Ramu Chenna, H. S. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 13 3497–3500.
- Prada, C., Holguin, A., González, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 20(1), 43. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc20-1.faci>
- Punil, R. (2017). Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “ La Taboada .”
- Segundo A., N., Hernández B., E., López V., O., & Torres A., O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*, pp. 17-26.
- Sass, Peter and Gabriele Bierbaum. 2007. “Lytic Activity of Recombinant Bacteriophage Phi11 and Phi12 Endolysins on Whole Cells and Biofilms of *Staphylococcus Aureus*.” *Applied and Environmental Microbiology* 73(1):347–52.

- Skowron, K., Kwiecińska-Piróg, J., Grudlewska, K., Świeca, A., Paluszak, Z., Bauza-Kaszewska, J., ... Gospodarek-Komkowska, E. (2018). The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 282(February), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>
- Oteo, J., & Alós, J. (2009). *Listeria* y *Listeriosis*. *Profesión Veterinaria*, Abr-Jul(71), 58–67. Retrieved from <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloid=705418>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., et al. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Watanabe, K. and S. Takesue. 1973. "Energy Requirement for the Formation of Blender-Resistant Complexes in *Lactobacillus* Phage Infection." *Journal Bibliografía 69 of General Virology* 20(3):319–26. 79.
- White, H., & Orlova, E. (2016). Bacteriophages: Their Structural Organisation and Function. In Intech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Watanabe, K., S. Takesue, and K. Ishibashi. 1979. "Adenosine Triphosphate Content in *Lactobacillus Casei* and the Blender-Resistant Phage-Cell Complex-Forming Ability of Cells on Infection with PL-1 Phage." *Journal of General Virology* 42(1):27–36.

- Yasuhiro Tanizawa, T. F. (2017). DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome. *Bioinformatics*, 3 doi: 10.1093/bioinformatics/btx713.