



Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola

**Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal Cavazos,
Julián Gamboa Delgado, y Carlos A.
Martínez Palacios**

Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola
2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

Directorio

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Bacteriófagos: Herramientas de Control Biológico para una Acuicultura Sostenible

Eduardo Quiroz-Guzmán^{1*}, Carlos Omar Lomelí-Ortega², Juan Manuel Martínez-Villalobos³

¹CONACYT-CIBNOR Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, 23096. La Paz, Baja California Sur, México

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, 23096. La Paz, Baja California Sur, México.

³Universidad Autónoma de Nuevo León Apartado postal 5 «F», 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

*Autor de correspondencia: E. Quiroz-Guzmán. Tel: +52 612 1238484 ext. 3664; fax: +52 612 122 53 22, e-mail: equiroz@cibnor.mx

Resumen

La terapia con fagos, trata infecciones bacterianas con bacteriófagos solos o en combinación con antibióticos tradicionales, se ha demostrado en casos de emergencia en diversos países; sin embargo, para que un bacteriófago sea útil para la terapia, debe aislarse del medio ambiente y demostrar que tiene ciertas características más allá de simplemente lisar cepas patógenas (bacteriana diana). Esto incluye características deseables tales como un rango de hospedadores relativamente amplio y la capacidad de formar un lisógeno. Algunas de estas variaciones son utilizadas regularmente por algunos grupos de investigación. En esta revisión, describimos (1) los procedimientos de aislamiento y las variaciones que están diseñadas para aislar fagos con rangos de hospedadores más amplios, (2) los procedimientos de caracterización utilizados para mostrar que un fago puede tener utilidad en la terapia con fagos, incluidos algunos de los límites de dicha caracterización y (3) las advertencias de análisis esenciales para obtener genomas de alta calidad, excluyendo candidatos no deseados, evaluando rigurosamente la seguridad de un genoma de fagos y evaluando la contaminación de secuenciación. Este flujo de trabajo se ha desarrollado de acuerdo con los estándares de la comunidad para la secuenciación de alto rendimiento de genomas virales, así como los principios para los fagos ideales utilizados para la terapia. Proponemos estas pautas como un estándar mínimo como nuevos candidatos a fármacos en investigación.

Palabras clave: *Bacteriófagos, Acuicultura, Fagoterapia, lítico, lisógenos*

1. Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) informó que la obtención de alimentos suficientes y nutritivos se ve comprometida por el rápido aumento de la población humana (FAO, 2019a). Como resultado, la acuicultura, ha sido una actividad crucial que ha contribuido a los alimentos de origen acuático para la seguridad alimentaria nacional y el desarrollo económico.

Actualmente, especies acuáticas valiosas, como camarones, peces marinos y de agua dulce, se consideran productos básicos para el mercado de exportación y ganancias monetarias. La producción total de camarón de cultivo mundial alcanzó casi 4 millones de toneladas en 2018, aumentando entre un 3 y un 5% con respecto a 2017 (FAO, 2019a).

También se estimó que la producción mundial de pescado aumentaría un 2,1% a 178,8 millones de toneladas en 2018, con 87 millones de toneladas (48,7%) derivadas de la acuicultura y 91.8 millones de toneladas (51,3%) de la pesca de captura (FAO, 2019a). Este cambio sustancial en el sector de la acuicultura resultó en que se superara la cantidad de pesca de captura silvestre para consumo humano. Además, los comportamientos de los consumidores se han vuelto cada vez más universales, especialmente en los países desarrollados. Por ejemplo, el consumo de camarón per cápita ha superado el máximo de 4.5 libras en 2018 (FAO, 2019a). China continental produjo 66,8 millones de toneladas de pescado para consumo humano en 2016, 49,2 millones de toneladas (74%) de la acuicultura y 17,6 millones de toneladas (26%) de la captura silvestre (FAO, 2019b).

Sin embargo, en la última década ha habido un incremento de enfermedades en poblaciones cultivadas y naturales, incluyendo peces, algas marinas e invertebrados (Egan & Gardiner, 2016). En las últimas décadas, los antibióticos fueron usados en los sistemas acuícolas como medida correctiva e inclusive preventiva; pero el uso indiscriminado de los mismos se consideró un riesgo para la salud humana por el potencial surgimiento y dispersión de bacterias patógenas resistentes y multi resistentes a antibióticos (Wittebole *et al.*, 2014; Gon Choudhury *et al.*, 2017). En consecuencia, la mayoría de los antibióticos fueron prohibidos en acuicultura, generando un vacío terapéutico que puso en riesgo la producción y el desarrollo del sector.

Para el combate a las infecciones por bacterias patógenas oportunistas en acuicultura se han empleado diferentes estrategias consideradas más seguras y amigables con el ecosistema, desafortunadamente su eficacia parece depender de lograr un balance químico, físico y biológico en los sistemas de producción, los cuales se encuentran en cambios constantes. En particular el

establecimiento de una microbiota saludable parece ser una estrategia ambientalmente segura, sin embargo, la aplicación directa de prebióticos, microorganismos benéficos (como los denominados probióticos), postbióticos, y para probióticos no ha logrado un control biológico con éxito. Otra alternativa que se está explorando actualmente es el uso de bacteriófagos, o simplemente fagos, los cuales no presentan un metabolismo intrínseco y funcionan solo como parásitos que llevan en su material genético la información necesaria para tomar la maquinaria celular de su hospedero y producir nuevos fagos que propaguen sus genes (Kutter & Sulakvelidze, 2004; Hanlon, 2007; Forterre & Prangishvili, 2009). Los fagos son considerados parásitos que solo se benefician con la infección y disminuyen la salud del hospedero. Sin embargo, los fagos pueden ser comensales (cuando el fago se beneficia sin afectar la salud del hospedero) o mutualistas (donde ambos se benefician), y a través de estos mecanismos proveer ventajas que promuevan la evolución y biodiversidad (Roossinck, 2015), en los ecosistemas, siendo las dos más importantes su influencia en la evolución de los genomas bacterianos a través de la lisogenia y su impacto en la modulación del flujo de materia y energía a nivel global (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

1.2 Manipulación de la microbiota

De manera cotidiana se ha buscado la eliminación de patógenos específicos para corregir infecciones, así como evitar la proliferación de los mismos para prevenirlas (Lomeli-Ortega 2018). En la tabla 1 se resumen los principales métodos para el control de patógenos basados en la manipulación de la microbiota. En el caso de los prebióticos para uso humano, su mecanismo se basa en el aporte de polisacáridos no digeribles en la dieta, los cuales favorecerán el crecimiento de bacterias comensales en el tracto (Roberfroid *et al.*, 2010). Sin embargo, su mayor limitación es la inhabilidad de predecir o cambiar la especificidad de la manipulación, aunado a las condiciones específicas de cada individuo. Los antibióticos por su parte, son agentes xenobióticos de amplio espectro que modulan el crecimiento microbiano a través de la inhibición de la maquinaria celular esencial. Sin embargo, debido al amplio espectro de acción causan cambios no deseables en la comunidad y la selección de cepas resistentes, las cuales actualmente son un problema de salud pública a nivel mundial. Uno de los mecanismos celulares usados para la manipulación de la microbiota es el trasplante de microbiota, el cual se basa en el reemplazo de la comunidad microbiana más resistente a infecciones que proviene de un donador sano (Borody & Khurts, 2012). A pesar de los efectos benéficos que se puedan tener, el mecanismo de acción no es claro y una

mejor aproximación sería la transferencia de una comunidad sintética la cual pueda replicar los procesos de un consorcio complejo, pero que contenga miembros definidos previamente caracterizados (Faith *et al.*, 2010).

Por otra parte, en el caso de los bacteriófagos el estado lisogénico es altamente evolucionado, requiriendo la co-evolución del fago y su hospedero que presumiblemente refleja varias ventajas para ambos. En la lisogenia el fago aporta genes de conversión que no solo modifican el fenotipo y genotipo de las cepas, sino que proveen ventajas adaptativas que contribuyen a la sucesión de las especies bacterianas (Lenski & Levin, 1985). Por su parte, el uso de fagos líticos tiene mayor aceptación, ya que estos fagos usan a su hospedero como una maquinaria de producción de nuevas partículas virales y al final del ciclo de replicación el hospedero muere (Breitbart 2012; Drulis-Kawa *et al.*, 2012). Subsecuentemente, en el ambiente, los nuevos fagos líticos pueden infectar y lisar a las bacterias vecinas (Doss *et al.*, 2017). Con la lisis no solo se da la remoción de un hospedero específico de la comunidad, también se crean nuevos nichos que especies menos competentes pueden ocupar y se estimula el crecimiento de ciertos miembros al liberarse sustratos orgánicos a partir de las células lisadas (Middleboe & Lyck, 2002). Dentro de las principales ventajas del uso de fagos como agentes antimicrobianos se encuentran la: I) actividad contra todo tipo de bacterias incluyendo multirresistentes a antibióticos; II) un espectro de acción focalizado en patógenos específicos, lo cual permite preservar el microbioma existente; III) bajo nivel de riesgo por efectos secundarios; IV) amplia distribución dentro el organismo tratado; V) presentan un bajo costo-beneficio y finalmente VI) mayor eficacia en comparación con los antibióticos, VII) los fagos se replican en el sitio donde se encuentra su hospedero, haciendo más eficiente el tratamiento y VIII) se auto-limitan al no estar presente su hospedero, y IX) a pesar de presentarse resistencia a los fagos esta se puede evitar con el uso de cocteles de fagos (Wittebole *et al.*, 2014; Pal, 2015).

Tabla 1 Métodos químicos, celulares y basados en bacteriófagos usados comúnmente en la manipulación de las comunidades microbianas. Tomado de Sheth *et al.*, (2016); Lomeli Ortega (2018).

Método (Base)	Formulación común	Mecanismo de acción
Prebióticos (Químico)	Fibras dietéticas, oligosacáridos	Promueve el crecimiento bacteriano, mecanismo generalmente desconocido
Antibióticos (Químico)	β -lactamas, aminoglicosidasas, glicopéptidos, quinolonas, metronidazole	Bloqueo de la síntesis de pared celular, proteínas, peptidoglicano y síntesis y replicación del material genético
Trasplante de microbiota (Celular)	Trasplante de microbiota fecal	Reemplazo de la comunidad nativa, mecanismo generalmente desconocido Competencia por nutrientes o nichos,
Probióticos (Celular)	Lactobacillus, Bifidobacteria, proteobacterias	producción de antimicrobianos, disrupción del quorum sensing, estimulación del sistema inmune
Bacteriófagos (Fagos)	Cepas específicas de fagos o cocteles de fagos	Lisis celular (lítico), integración genómica (lisogénico)

1.3 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son las entidades biológicas más abundantes en el medio marino y desempeñan papeles importantes, por ejemplo, estructurar la diversidad y la evolución bacteriana mediante la selección de genotipos resistentes a fagos y como impulsores clave de la transferencia horizontal de genes (Touchon, Moura de Sousa & Rocha 2017). El fuerte potencial lítico de los fagos contra huéspedes bacterianos marinos específicos ha llevado a un creciente interés en el uso terapéutico de fagos líticos (terapia con fagos) para controlar las infecciones bacterianas patógenas en la acuicultura (Quiroz-Guzman *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2019; Lomeli-Ortega *et al.*, 2020; Veyrand-Quiroz *et al.*, 2020). Se han caracterizado varios vibriofagos de sistemas marinos en términos de morfología, composición genómica y propiedades del rango de hospedadores (Kellogg *et al.*, 1995; Comeau, Chan & Suttle 2006; Tan, Gram & Middelboe 2014; Kalatzis *et al.*, 2017). En particular, se encontró que un fago, KVP40, tenía un rango de hospedadores muy amplio, infectando al menos ocho especies de *Vibrio* y una de *Photobacterium* (Matsuzaki *et al.*, 1992). El receptor de este fago se ha identificado como proteína de membrana externa K (OmpK), que generalmente está presente en el grupo *Vibrio* (Inoue, Matsuzaki & Tanaka 1995). Además, los vibriofagos se han aplicado con éxito en ensayos de terapia de fagos con resultados prometedores en la supervivencia de peces y crustáceos (Pereira *et al.*, 2011; Higuera *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Kalatzis *et al.*, 2016; Kalatzis *et al.*, 2018; Rørbo *et al.*, 2018; Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018; Castillo *et al.*, 2019; Lomeli-Ortega *et al.*, 2020; Veyrand-Quiroz *et al.*, 2020). Donde la mayoría de los experimentos de laboratorio *in vitro* se ha observado un control con los fagos de cepas de *V. parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *V. campbellii*, *V. anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, sin embargo, el recrecimiento de células después de la infección por fagos sugirió la aparición de clones resistentes a fagos después de la exposición a fagos (Mateus *et al.*, 2014; Tan 2014; Kalatzis *et al.*, 2016) (Figura 1). En conjunto, estos estudios enfatizaron que una caracterización detallada de las interacciones fago-huésped y las estrategias de defensa del fago en los patógenos es esencial para la aplicación exitosa del control de patógenos oportunistas basado en fagos. De hecho, Abedon *et al.*, (2011) proponen que los bacteriófagos puedan ser utilizados tanto de forma profiláctica como terapéutica, ya que tienen como objetivo mantener el balance del ambiente enfocándose solo en bacterias patógenas específicas.

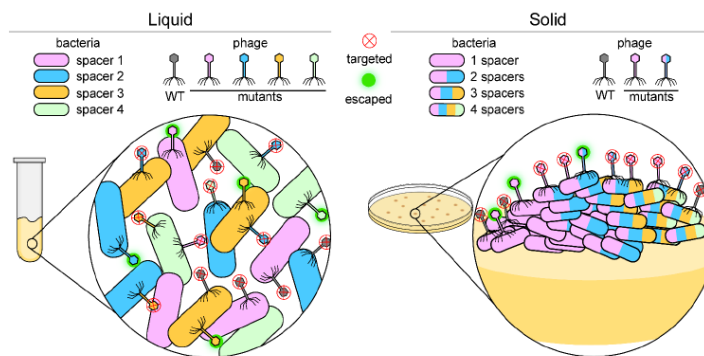


Figura 1. Bacteria versus bacteriófagos para defenderse de los fagos, las bacterias (cápsulas coloreadas) adquieren una región del genoma del fago y la insertan en su propio genoma como "espaciador". Cuando crecen en un ambiente líquido (izquierda), las células bacterianas individuales generalmente adquieren un solo espaciador que se dirige solo a una región del fago de tipo salvaje (WT) (que se muestra en gris). En la figura, cada célula bacteriana tiene uno de cuatro espaciadores diferentes (que se muestran en azul, verde, naranja y rosa). Sin embargo, los fagos mutan en un esfuerzo por eludir estas defensas: una mutación en la región del genoma del fago correspondiente a, digamos, un espaciador azul significa que el fago puede atacar y escapar de la defensa de las bacterias con espaciadores azules (círculo verde difuso), pero no bacterias con espaciadores de color verde, naranja o rosa (X roja dentro de un círculo). Cuando crece sobre una superficie sólida (derecha), si una célula individual adquiere, digamos, un espaciador rosa, pasará a formar una colonia de células resistentes a los fagos (recuadro). Si un fago gana una mutación en la región objetivo del espaciador rosa, el fago escapará a la detección. Para mantenerse protegidas, algunas células bacterianas dentro de la colonia adquieren múltiples espaciadores (células bacterianas multicolores) y pueden combatir varios fagos mutantes Tomada de Schelling y Sashital 2020.

1.4 Características deseables de los fagos para la terapia con fagos

Los fagos son altamente diversos en sus características físicas y genómicas, por lo que es importante hacer una selección previa de los mismos para llegar a una terapia exitosa. Dentro de los primeros puntos a considerar es el uso de fagos líticos y descartar el uso de fagos lisogénicos, ya que estos últimos dentro de su ciclo de replicación aportan genes de conversión que no solo modifican el fenotipo y genotipo de las cepas sino que proveen ventajas adaptativas que contribuyen a la sucesión de las especies bacterianas (Lenski & Levin, 1985), pueden permanecer en estado lisogénico por tiempo indefinido y conferir genes que aumentan la virulencia o inclusive convertir a hospederos no virulentos a virulentos (Obeng *et al.*, 2016; Doss *et al.*, 2017). El uso de fagos líticos tiene mayor aceptación ya que estos fagos usan a su hospedero como una maquinaria de producción de nuevas partículas virales y al final del ciclo de replicación el hospedero es destruido (Breitbart 2012; Drulis-Kawa *et al.*, 2012). Posteriormente, la nueva progenie liberada al ambiente es capaz de infectar células vecinas y otros hospederos susceptibles (Doss *et al.*, 2017); permitiendo no solo la remoción de un hospedero específico de la comunidad, también se crean nuevos nichos disponibles que especies menos competentes pueden ocupar y se estimula el crecimiento de ciertos miembros de la comunidad al liberarse sustratos orgánicos a partir de las células lisadas (Middleboe & Lyck, 2002).

Otra de las características que se buscan en los fagos es una amplia tolerancia a diferentes parámetros ambientales como la temperatura, salinidad, radiación UV y pH, dependiendo del sitio de aplicación. Los fagos varían ampliamente en su sensibilidad a estos agentes físicos y químicos, en maneras que son generalmente impredecibles o necesitan ser determinadas experimentalmente en cada caso (Kutter & Sulakvelidze, 2004). En el caso de radiación ultra violeta, se ha observado que los fagos son sensibles en un intervalo de 260-315 nm de UV (Figura 2a), en el caso de los fagos lisogénicos estos se ven forzados a entrar al ciclo lítico cuando la luz UV daña el ADN del hospedero (Raya & Hébert, 2009).

Con respecto a la temperatura, esta afecta a los fagos de diferentes maneras, ya que interviene en el reconocimiento, unión, penetración y multiplicación de los fagos en sus hospederos (Silva *et al.*, 2014b). Por lo general, los fagos son más estables a bajas temperaturas (Gill *et al.*, 2010), pero lo mismo no sucede a mayores temperaturas (Figura 2b). El fago P22 que infecta a *Salmonella entérica* genera su mayor producción de fagos a temperaturas entre 30 a 39 °C (Pope *et al.*, 2004). Sin embargo, esto al parecer no es aplicable a todos los fagos, ya que la teoría de que “más caliente es mejor” menciona que los genotipos de fagos con temperaturas óptimas altas tienen una mayor tasa de crecimiento máxima y tienen un mayor intervalo de temperatura (Knies *et al.*, 2009).

La salinidad y el pH juegan un papel muy importante en la estabilidad y actividad de la partícula viral y en la conformación de los receptores en las células bacterianas (Wichels *et al.*, 1998; Binetti *et al.*, 2002; Seaman & Day, 2007). A salinidades bajas se da una interacción de los iones con las proteínas y se estabiliza la estructura de las proteínas a través de la neutralización de las cargas; sin embargo, a salinidades altas se genera una desnaturalización y se puede también afectar la estabilidad del ácido nucleico del fago (Fennema, 1996; Silva *et al.*, 2014b) (Figura 2c). Por su parte, el pH está relacionado con el anclaje, infectividad, replicación intracelular y multiplicación de los fagos (Leverentz *et al.*, 2001; 2004), donde valores entre 6 y 9 generalmente son óptimos para los fagos y otros valores generan una disminución de la actividad (Pirisi, 2000; Jepson & March, 2004; Silva *et al.*, 2014b). Una manera de evitar los problemas asociados a la susceptibilidad de los fagos a las condiciones ambientales es realizar el aislamiento de los fagos a partir de las mismas zonas o sitios donde se busca aplicar la fagoterapia. Con lo anterior, los fagos aislados ya habrán pasado por un proceso previo de selección y se espera que tengan una mayor tolerancia a las condiciones ambientales que se puedan presentar en dicho lugar, pero es importante aun así realizar la caracterización para conocer los límites de cada fago a las principales condiciones ambientales y

con ello tener una base de datos amplia que permita una mejor selección de los fagos a implementar durante una terapia.

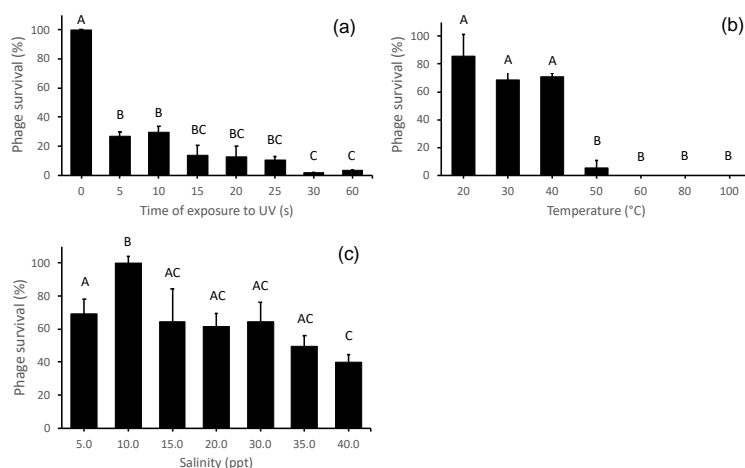


Figura 2. Análisis de estabilidad del bacteriófago vB_Vc_SrVc9, (a) Influencias de UV después de la incubación en diferentes momentos, (b) Influencias de diferentes temperaturas después de una hora de incubación, (c) Influencias de diferentes salinidades de TSB + durante una hora de incubación. Los datos fueron los títulos de fagos y se determinaron utilizando el método de agar de doble capa. Los datos son la media y la desviación estándar de tres ensayos independientes. Las diferencias estadísticas ($p < .05$) se indican con diferentes letras mayúsculas. Tomado de Lomelí-Ortega *et al.*, (2020)

1.5 Rango de hospedero y eficiencia de plaqueo

Una de las primeras pruebas *in vitro* que se realizan para conocer el potencial de los fagos es el rango de hospedero, el cual utiliza la prueba de gota como base para conocer si un fago es capaz de generar una zona de lisis sobre el crecimiento de una cepa bacteriana. Cada cepa bacteriana que fue lisada se considera cepa susceptible y se saca un porcentaje basado en el número de cepas lisadas sobre el total de cepas evaluadas (Mirzaei *et al.*, 2015). Con esta información somos capaces de evaluar la capacidad de reconocimiento y lisis del fago con respecto a un grupo de potenciales hospederos. A pesar de que podemos aislar fagos de una misma fuente es posible que estos presenten una gran diferencia en sus perfiles de lisis, desde un valor estrecho cuando solo es capaz de reconocer pocas o inclusive a una sola cepa bacteriana hasta un valor amplio donde no solo se reconocen varias cepas sino inclusive cepas de diferentes especies relacionadas (Salazar-Llanos, 2008). Esta variación se debe a que los fagos reconocen a las bacterias a través de los receptores de la superficie de la membrana (Gram negativa) o pared celular (Gram positiva) y no todos los fagos cuentan todos los receptores por lo que una cepa de bacteria puede ser infectada por diferentes fagos usando receptores específicos o varias cepas de bacterias pueden ser infectadas por un mismo fago

a través de un receptor conservado (Comeau *et al.*, 2006; Labrie *et al.*, 2010). Considerando este punto, muchas veces durante la evaluación del rango de hospederos podemos tener falsos negativos, ya que los fagos pueden ser capaces de infectar al hospedero, pero no generan una zona de lisis definida debido a una baja susceptibilidad de la cepa bacteriana relacionada a la cantidad de sitios de reconocimiento que el fago puede utilizar (Rakhuba *et al.*, 2010). Stalin & Srinivasan (2016) reportaron que un fago específico para *V. parahaemolyticus* aparentemente no era capaz de lisar cepas de otras cepas de *V. alginolyticus* a través de prueba de puntos, pero si fueron capaces de observar lisis a través de la eficiencia de plaqueo. La eficiencia de plaqueo consiste en realizar la medición de la progenie de una muestra de fagos usando un nuevo hospedero y comparando ese valor con respecto al obtenido con la cepa hospedera original (Hyman & Abedon, 2010). Aunque la cantidad de progenie cuantificada pueda ser muy baja, podemos conocer si realmente el fago es capaz de lisar nuevos hospederos con una mayor precisión. Para estandarizar los valores de la eficiencia de plaqueo, Khan-Mirzaei & Nilsson (2015) proponen una serie de intervalos para su clasificación. Los autores manejan como alta producción a los valores superiores a 0.5, producción media cuando el valor es mayor a 0.1 y menor a 0.5, producción baja cuando el valor es mayor a 0.001 y menor a 0.1; y por último una producción ineficiente cuando el valor es menor a 0.001 (Tabla 2). Usando este sistema de clasificación, Kalatzis *et al.*, (2016) encuentran que dos de sus fagos son capaces de usar como hospederos a varias cepas de *V. alginolyticus* con una producción que varía entre alta, baja o ineficiente, pero solo son capaces de lisar a una cepa de *V. harveyi* y una de *V. parahaemolyticus* con una producción alta y baja respectivamente. Aunque los autores mencionan que esta capacidad de usar especies del clado Harveyi necesita ser explorada, la naturaleza conservativa en las estructuras de los receptores de fagos de lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa puede ser la explicación de esta capacidad para infectar diferentes especies de *Vibrio* (Rakhuba *et al.*, 2010). Por lo anterior, el uso de un método basado en la eficiencia de plaqueo puede ser una mejor opción para conocer el potencial de los fagos y poder seleccionar con mayor precisión a los fagos para su uso terapéutico o biotecnológico.

Tabla 2. Rango de hospedadores del bacteriofago vB_Pd_PDCC-1 contra *Photobacterium damsela* y *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii* y *V. alginolyticus*. La EOP se expresa como: la fracción de la infectividad de los fagos frente a las cepas probadas a la infectividad de los fagos frente a la cepa huésped. Alta (EOP \geq 0,5), Moderada (EOP \geq 0,1- <0,5) y Baja (EOP \leq 0,1). Tomada de Veyrand-Quirós *et al.*, (2020)

Cepa	Nombre	Titulación (UFP/mL)	EOP		
			Alta	Moderada	Baja
CAIM 1910	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	2.17E+08	1	ND	ND
CIBGEN- 001	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.38E+09	6.38	ND	ND
CIBGEN- 002	<i>Vibrio campbellii</i>	8.00E+08	3.69	ND	ND
CIBGEN- 003	<i>Vibrio campbellii</i>	7.42±09	5.79	ND	ND
CIBGEN- 004	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.18E+09	5.46	ND	ND

*ND, no detectado

1.6 Otras propiedades

A pesar de que la aparición de cepas resistentes a fagos es una característica no deseada y difícil de evitar, se puede tener cierta ventaja ya que la presión selectiva por fagos desencadena una serie de cambios en el hospedero que pueden reducir su peligrosidad. Uno de estos cambios es el relacionado a la pérdida o cambio en los receptores de la superficie que evitan que el reconocimiento por parte del fago. Para identificar esta resistencia se han realizado cinéticas de absorción de fagos en cepas resistentes y se ha hecho proteómica comparativa de las cepas susceptibles y resistentes para evaluar el costo metabólico (Stoddard *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010). En la cinética de absorción fagos en cepas resistentes de *Roseobacter denitrificans* y *Synechococcus* spp. se observó una disminución de la tasa de absorción de los fagos, lo cual sugiere cambios en los receptores del hospedero que servían de anclaje a los fagos. Al realizar la proteómica comparativa de cepas susceptibles se observaron cambios significativos en las proteínas de membrana, las cuales fueron desreguladas en las cepas resistentes a fagos, lo cual puede deberse al uso de receptores similares entre fagos y como consecuencia ser una ventaja en el ambiente natural donde las bacterias están expuestas a una alta diversidad de fagos. Sin embargo, estas modificaciones no siempre derivan en una ventaja para las bacterias en el ambiente ya que estos mismos receptores son usados para la asimilación de nutrientes, anclaje al hospedero u otros sustratos, movilidad u otras funciones importantes; dando como consecuencia un decremento de la competitividad de la bacteria (Breitbart, 2012). Middelboe *et al.*, 2009 demostraron que las cepas de *Flavobacterium* resistentes a fagos presentaron una reducción en la habilidad para la asimilación de varias fuentes de carbono y por su parte Gordillo-Altamirano *et al.*, 2021 demostraron que las cepas resistentes a fago de *Acinetobacter baumannii* mostraron una susceptibilidad a antibióticos con respecto a las cepas no expuestas a fago, con lo cual se demuestra una sensibilidad debida a la presión selectiva de fagos. Esto sugiere que el coste metabólico para la adquisición de la resistencia a fagos no solo conlleva a la pérdida de la capacidad metabólica de las cepas, también deriva en una posible sensibilización a agentes antimicrobianos como los antibióticos lo cual abre un abanico de oportunidades para el combate de cepas multirresistentes a antibióticos en salud humana y la industria alimentaria.

1.7. Fagoterapia en acuicultura

Existen una amplia cantidad de trabajos y revisiones que evalúan el papel de los virus en la estabilidad, funcionamiento y diversidad en los ambientes naturales marinos y terrestres, y su potencial como agentes de biocontrol en humanos, agricultura e industria alimentaria (Suttle, 2005, 2007; Weinbauer, 2004; Abedon *et al.*, 2011). Aunque el uso de fagos para el control de infecciones bacterianas en acuicultura ha tenido un despunte en los últimos 20 años, aún es limitada la información acerca de su aplicación para el control de enfermedades bacterianas en sus diversas versiones, individual, en cocteles o en combinación con otros tratamientos. Con respecto al uso de fagos individuales, se ha reportado que estos reducen de forma significativa la mortalidad y presencia de signos de infección en camarones (Alagappan *et al.*, 2010; Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014; Patil *et al.*, 2014), artemia (Martínez-Díaz & Hipólito-Morales, 2013; Lomelí-Ortega *et al.*, 2021), bivalvos (Pereira *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018), peces (Matsuoka *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014a; Rørbo *et al.*, 2018, Veyrand-Quirós *et al.*, 2020) y pepinos de mar (Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). En todos los casos se observaron efectos benéficos debido a la presencia de fagos en el sistema; sin embargo, en los experimentos solo se evaluó una cepa blanco susceptible y sin la presencia de cepas resistentes, lo cual ocasiona una disminución en la efectividad del tratamiento. Para evitar estos inconvenientes, el uso de cocteles de fagos es una manera sencilla y eficaz de reducir o eliminar a cepas resistentes a fagos. Li *et al.*, (2016), evaluaron la capacidad preventiva de un coctel de tres fagos para el control del patógeno *V. splendidus* en organismos juveniles de pepino de mar *Apostichopus japonicus*. Los autores reportan que el uso preventivo del coctel fue más eficiente que los fagos individuales para controlar la mortalidad asociada a *V. splendidus* al mantener una supervivencia de 82 % de los organismos, lo cual fue un 32 % más efectivo que los tratamientos individuales. En la misma línea de investigación, Zhang *et al.*, (2015) reportaron que el uso combinado de dos fagos específicos contra *V. alginolyticus* y un fago específico contra *V. cyclitrophicus* son capaces de mantener la supervivencia de juveniles de pepino de mar en un 73 % comparado con el 3 % observado en el grupo control sin tratar. Por su parte, Stalin & Srinivasan (2016) aislaron el fago VPP1, capaz de lisar no solo a su cepa blanco *V. harveyi*, sino también son capaces de infectar cepas de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. Estos fagos fueron usados en coctel durante pruebas de reto con nauplios de *Penaeus monodon*, encontrando que las mayores reducciones en los conteos de *V. harveyi* y las mayores supervivencias de organismos se presentan con la mezcla de los tres fagos.

Aunque el uso de bacteriófagos para el control poblaciones de patógenos es eficaz sin la necesidad de terapias complementarias (Kim *et al.*, 2014, 2017), en microambientes de organismos (intestino, vagina, etc.) no se observa una restauración completa de la comunidad microbiana (Kim *et al.*, 2014, 2017; Vorobey *et al.*, 2017). Esto se debe a que los bacteriófagos están enfocados en eliminar patógenos específicos sin causar ningún cambio en otros microorganismos y/o el ambiente. En contraste, el uso de bacteriófagos y probióticos si puede generar una restauración completa de la composición de la microbiota de organismos (Vorobey *et al.*, 2017); ya que los probióticos pueden tomar los nichos disponibles y proveer beneficios adicionales como: valor agregado al alimento, contribución enzimática a la digestión, inhibición de microorganismos no importantes en los sistemas, y factores que promuevan el crecimiento o incrementen la respuesta del sistema inmune (Wang *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, el uso de bacteriófagos en conjunto con bacterias probióticas para el control de infecciones ha tomado gran interés debido a que ambos ofrecen como ventajas la carencia de producción de sustancias residuales nocivas y eliminación de bacterias resistentes a antibióticos (Maretto-Gonçalves *et al.*, 2011; Woo & Ahn, 2014). Sin embargo, el uso combinado de fagos y probióticos en acuicultura solo se ha evaluado *in vitro* por pocos autores. Baek *et al.*, (2013) demostraron que el uso combinado de fagos y *Bacillus subtilis* posee una alta actividad antimicrobiana contra el patógeno de peces *Edwardsiella tarda*, por lo que sugieren la posibilidad de desarrollar un aditivo alimenticio basado en esta combinación para el tratamiento de enfermedades infecciosas ocasionada por *E. tarda* en peces de cultivo. Quiroz- Guzmán (2013) por su parte, demuestra que el uso combinado de fagos y probióticos en pruebas de reto con *A. franciscana* mejoró la tasa de eclosión de los quistes, la supervivencia de los nauplios, e inclusive redujo los tiempos de eclosión con respecto a aquellos expuestos a cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. Algunos de los logros relacionados con la terapia de bacteriófagos en la acuicultura, incluido el aislamiento de fagos y las posibles aplicaciones, se resumen en la Tabla 3. Esta recopilación de información contribuye a la identificación de algunos de los aspectos más relevantes del uso de fagos como agentes antimicrobianos en la acuicultura.

Tabla 3. Investigación sobre el potencial de bacteriófagos

Producto de acuicultura	Agente etiológico	Bacteriofago	Resultados	Referencia
<i>Anguilla Japonica</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	ET-1	Mortalidad (92,6%) afectados 25 de 27 Cepas de <i>E. tarda</i> y redujo el recuento bacteriano para menos del 0,15%	Wu y Chao (1982)
<i>Seriola quinqueradiata</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	Siphoviridae PLgY-16, PLgY-30 y PLgW-1	La tasa de supervivencia fue mucho más alto en jurel con fago durante el reto con <i>L. garvieae</i>	Nakai <i>et al.</i> (1999)
<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Myoviridae (PPpW-3) and Podoviridae (PPpW-4)	Efecto protector contra <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> inducido experimentalmente demostrando así el uso profiláctico de fagos para prevenir transmisión horizontal del patógeno	Park <i>et al.</i> (2000), Nakai y Park (2002)

<i>Penaeus monodon</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Myoviridae</i> (VHLM)	VHML mostró un estrecho rango de hospedero y un aparente preferencia por <i>V. harveyi</i> en lugar de otros 63 aislados de <i>Vibrio</i> y otros 10 géneros	Oakey y Owens (2000), Oakey <i>et al.</i> (2002)
<i>Oncorhynchus fontinalis</i> formerly, <i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	HER 110	Retraso de la infección (7 días). Más de uno fago podría infectar la cepa de bacterias y mutantes resistentes a fagos HER 110 fueron sensible a otros fagos, tenía una generación más lento tiempo, y muy bajo éxito de la reposición	Imbeault <i>et al.</i> (2006)
Camarón	<i>Vibrio harveyi</i>	VH1 - VH8	Todos los aislamientos de bacteriófagos (VH1-VH8) provocaron la lisis de las células bacterianas del huésped en 2 h. La curva de propagación para cada fago muestra un tiempo de ráfaga que comenzó entre 1 y 10 h.	Srinivasan <i>et al.</i> (2007)

Larva de <i>Phyllosoma panulirus ornatus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Siphoviridae</i> (VhCCS-01, VhCCS-02, VhCCS-04, VhCCS-06, VhCCS-17, VhCCS-20)	Los <i>Myoviridae</i> (VhCCS-19 y VhCCS-21) lisogénicos e inducen la producción de bacteriocina en un número limitado de bacterias hospedadoras (<i>V. harveyi</i> cepa 12).	Crothers-Stomps <i>et al.</i> (2010)
Bagre	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Siphoviridae</i> (UeiDWF, UeiAU y UeiMSLS)	El análisis genómico reveló que se trata de fagos virulentos, sin capacidad de lisogenia o expresión de genes de virulencia.	Carrias <i>et al.</i> (2011)
<i>Salmo salar</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	CHOED	Disminución de la mortalidad del 95% al 30%	Higuera <i>et al.</i> (2013)
<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	A3S y Vpms1	En ambos casos, la aplicación precoz (a las 6 h postinfección) fue eficaz para evitar la mortalidad. Las aplicaciones de fagos retardados (> 6 h después de la infección) obstaculizaron la mortalidad y el progreso de la infección.	Lomeli-Ortega y Martínez-Díaz (2014)

<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	pVp-1	Este fago fue capaz de infectar el 90,9% (20 cepas entre 22 cepas) de las cepas <i>V. parahaemolyticus</i> relacionadas con AHPND / EMS	Woo Jun <i>et al.</i> (2016)
<i>Solea senegalensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	AS-A	Los resultados mostraron que luego de 6 h de tratamiento el fago inhibió el crecimiento de <i>A. salmonicida</i> tanto en cultivos discontinuos como en agua de mar en presencia de peces juveniles (≈ 4 y $2.5 \text{ Log PFU mL}^{-1}$, respectivamente)	Silva <i>et al.</i> (2016)
<i>Penaeus vannamei</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vp1, VP7 y VP9	Los resultados indicaron que los fagos también infectan a <i>V. parahaemolyticus</i> en el intestino del camarón y sus desechos producen una respuesta inmune en los camarones, que pueden combatir cualquier infección no específicamente como estimulantes inmunes.	Alagappan <i>et al.</i> (2016)

<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	Str-PAP-1	El bacteriófago Str-PAP-1 puede usarse para tratar o prevenir la estreptococosis causada por <i>S. parauberis</i> . Además, los efectos de la suplementación dietética con bacteriófago Str-PAP-1 en dosis variables (T1: 1×10^5 ufp / g, T2: 1.5×10^5 ufp / gy T3: 2×10^5 ufp / g) sobre el rendimiento del crecimiento de los peces , se evaluaron la incidencia de infecciones por <i>S. parauberis</i> y la mortalidad de los peces.	Sun Kwon <i>et al.</i> (2017)
<i>Haliotis laevigata</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	vB_VhaS-a y vB_VhaS-tm	Los resultados del bioensayo mostraron que el control negativo y el control de fagos fueron estadísticamente idénticos, con una supervivencia del 100%, pero diferentes del control bacteriano positivo, con una supervivencia del 0%.	Wang <i>et al.</i> (2017)

<i>Artemia franciscana</i>	<i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vpms1, A3S, Aie, F8 y F12	Los resultados también revelaron un mayor éxito de eclosión (100% en ambos casos) y una tasa de supervivencia (de 85 a 89%) en los grupos tratados con cócteles de fagos	Quiroz Guzman <i>et al.</i> (2018)
<i>Apostichopus japonicus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. cyclitrophicus</i> y <i>V. splendidus</i>	PVA1, PVc1 y PVS3	Durante el tiempo de cultivo de 48 días, los recuentos totales de <i>Vibrio</i> en los grupos de tratamiento con fagos disminuyeron y se detectaron partículas de fagos en los fluidos celómicos de pepinos de mar durante el tiempo de cultivo.	Zhen Li <i>et al.</i> (2019)
Larvas de peces	<i>Vibrio anguillarum</i>	KVP40	Los tratamientos combinados e individuales se probaron en sistemas de alimentación viva no axénicos (es decir, microalgas Tetraselmis suecica y camarones de salmuera Artemia salina) obtenidos de una unidad comercial de cría de larvas.	Rasmussen <i>et al.</i> (2019)

<i>Pyropia haitanensis</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	vB_VmeM-Yong XC31	La tasa de supervivencia más alta (83%) de CLL infectadas se obtuvo cuando la densidad de <i>V. mediterranei</i> 117-T6 era 108 UFC / ml y la multiplicidad de infección (MOI) del fago XC31 era 1. Zhu <i>et al.</i> (2020)
<i>Apostichopus japonicus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vB_VpaP_VP- ABTNL-1 y vB_VpaS_VP- ABTNL-2	Los cultivos tratados con fagos in vitro mostraron una inhibición significativa (P <0,05) del crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> VP-ABTNL en comparación con los grupos no tratados. Ren <i>et al.</i> (2019)
<i>Seriola rivoliana</i>	<i>Photobacterium damselae</i>	vB_Pd_PDCC-1	El uso de fagos durante el desarrollo ontogénico demostró que el uso de fagos, Veyrand- representa una estrategia prometedora para reducir la mortalidad de organismos de cultivo causada por bacterias patógenas. Quirós <i>et al.</i> (2020)

<i>Artemia franciscana</i>	<i>Vibrio campbellii</i>	vB_Vc_SrVc9	vB_Vc_SrVC9 es un fago novedoso y una alternativa ecológica para aplicaciones terapéuticas y fines biotecnológicos porque es estable en diferentes condiciones ambientales. Lomeli-Ortega <i>et al.</i> (2020)
<i>Larimichthys crocea</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	vB_VhaS_PcB-1G	La frecuencia del gen de virulencia toxR alcanzó hasta el 75,9%, mientras que el 63% de las cepas portaban al menos cuatro genes de virulencia. Se aisló un nuevo fago específico de <i>V. harveyi</i> vB_VhaS_PcB-1G de Larimichthys crocea en el Mar de China Oriental. Wu <i>et al.</i> (2021)

2. Diversidad genómica y filogenia de bacteriófagos

La clasificación taxonómica de los taxones de fagos se lleva a cabo por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Adams, 2017). Aunque la clasificación de fagos se basó históricamente en características como el tipo de genoma (ssDNA, ssRNA, dsDNA o dsRNA), la morfología viral y el rango de hospedadores, actualmente se está sometiendo a una revisión importante, principalmente utilizando métodos basados en genómica. Por ejemplo, el informe de ICTV de 1999 clasificó los fagos en tres familias, 16 géneros y 30 especies, mientras que el informe de 2018 los agrupó en cinco familias, 26 subfamilias, 363 géneros y 1320 especies (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases). Se han modernizado directrices integrales para la clasificación de fagos y se espera que la lista de taxones de virus aumente sustancialmente en los próximos años (Adriaenssens y Brister, 2017; Dion *et al.*, 2020). Principalmente porque dependiendo de la taxonomía de los mismos, más específicamente del orden, el material genético está empaquetado dentro de la cápside, la cual puede variar en estructuras como poliédrico, filamentoso, pleomórfico o conectado a una cola (Adams 2017). La gran mayoría de los fagos descritos y registrados en bases de datos públicas, son de morfología de cola con un dsDNA dentro del orden de los Caudovirales y comprenden 5 familias Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae, Ackermannviridae, Herelleviridae (Figura 3) (Ackermann 2007).

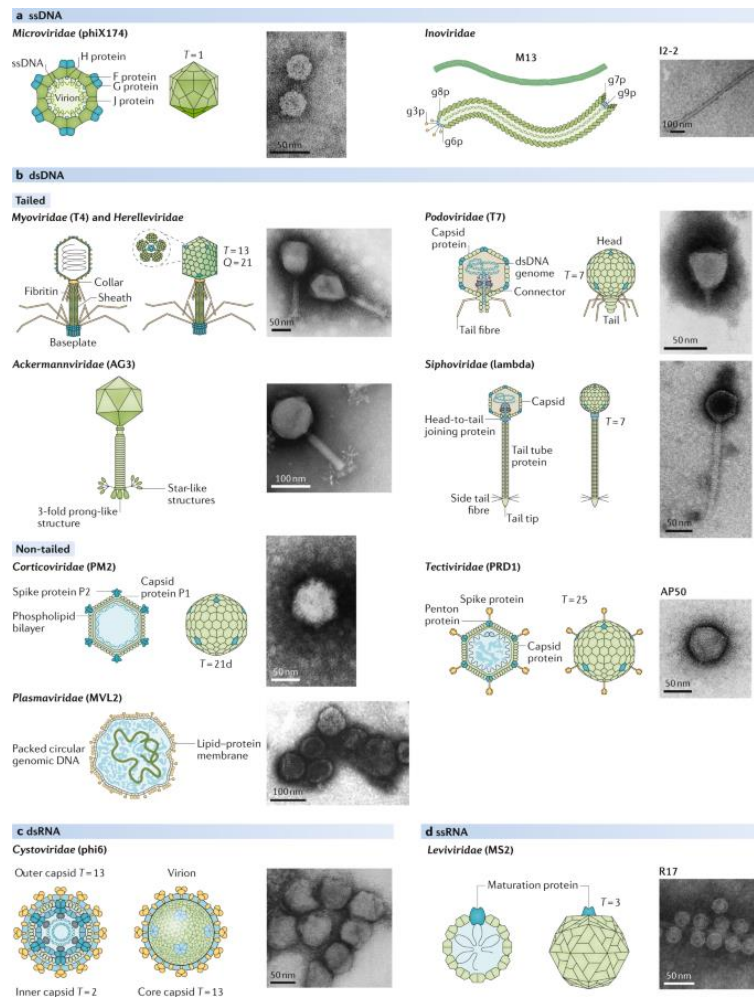


Figura 3. Clasificación de fagos basada en morfología y tipo de genoma. Se muestran una representación esquemática (SR) y una micrografía electrónica de transmisión (TEM) para cada morfología. a) Los Microviridae tienen cápsides icosaédricas y pequeños genomas circulares de ADN monocatenario (ssDNA). El genoma de los fagos filamentosos de la familia Inoviridae está compuesto por una molécula de ssDNA superenrollada circular que está empaquetada dentro de un filamento largo compuesto por miles de copias de la proteína de la cápside principal. b) La mayoría de los fagos caracterizados tienen cola con genomas de ADN bicatenario (dsDNA) y pertenecen al orden Caudovirales. Hasta la fecha, se han descrito cinco familias para este orden: Myoviridae (T4), Podoviridae (T7), Ackermannviridae y Siphoviridae. Herelleviridae, aunque es una familia oficial, comparte la misma morfología que Myoviridae. Los Corticoviridae tienen un genoma de dsDNA circular y una cápside compuesta por una membrana lipídica interna rodeada por MCP. Tectiviridae tienen una cápside icosaédrica, que contiene un genoma de dsDNA lineal y una membrana lipídica interna. Los virus que pertenecen a la familia Plasmaviridae tienen un genoma de dsDNA circular rodeado por una envoltura lipídica y sin cápside. c) Cystoviridae tiene un genoma de ARN bicatenario tri-segmentado (ARNdc) contenido dentro de una cápside esférica con tres capas estructurales: una membrana lipídica externa y una cápside interna de dos capas. d) Los leviviridae tienen un genoma ssRNA que codifica solo cuatro proteínas y una cápside con geometrías icosaédricas y esféricas. Tomado de Dion *et al.*, (2020).

El número y la diversidad de bacteriófagos que se identifican cada día incrementa a un ritmo acelerado, de hecho el número de genomas completos depositados en bases de datos como GenBank, se ha duplicado en los últimos años, gracias a los estudios de investigación, los avances en la secuenciación y análisis de los genomas de los fagos, incluyendo el ensamblaje, anotación y uso

(Adams 2017) y aunque los fagos son considerados inocuos para los mamíferos y plantas, no existe una guía oficial para la evaluación de la seguridad genética de los fagos antes de su uso clínico, y gran parte de las evaluaciones propuestas para su uso como agente terapéuticos en humanos, se encuentran en una etapa experimental, mientras son aprobados por organismos como la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) en Estados Unidos. Esta falta de directrices puede limitar su avance como agentes terapéuticos en humanos. En la actualidad, aunque se han desarrollado diferentes herramientas para la caracterización de los genomas de los fagos, se necesitan análisis complementarios para la evaluación de la seguridad de los genomas, principalmente por la interpretación errónea de datos poco confiables que terminan en bases de datos públicas.

Para poder abordar este reto, se han propuesto puntos de control básicos clasificados en dos categorías, obtención de un genoma de alta calidad y evaluación sólida de la composición genética (Philipson *et al.*, 2018). La calidad de un genoma puede ser definida por la integridad de las secuencias que lo componen (parcial o completa), y la categoría recomendada para los virus que se utilizan en la investigación (como en el desarrollo de vacunas) debe ser considerado como completo, principalmente por la naturaleza propia del genoma, que varía entre los 3 mil (Friedman *et al.*, 2009) y 650 mil (Michniewski *et al.*, 2021) pares de bases (pb), en la que debe existir una única secuencia consenso que represente el 100% del genoma con todos los marcos de lectura abierto (ORF) identificados (Figura 4) (Ladner *et al.*, 2001). Este proceso, conocido como anotación, representa un paso crucial dentro del reporte final del genoma propuesto, independientemente de su uso final como terapéutico o biotecnológico.

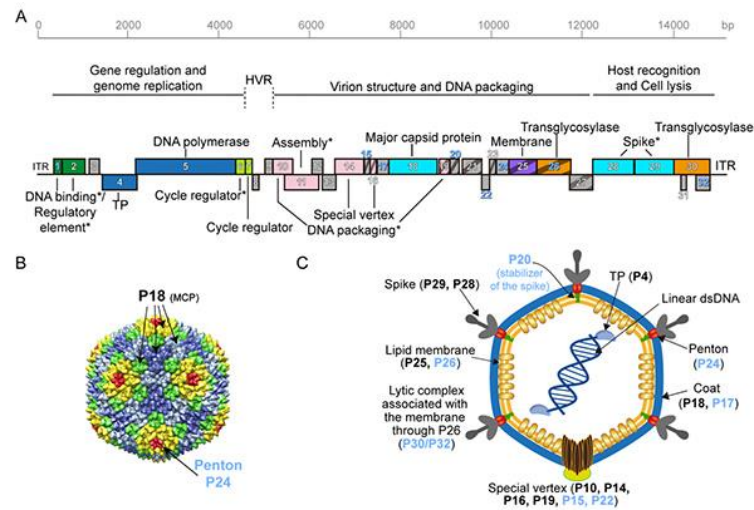


Figura 4. Genoma del virus Bam35 (A) Mapa genético del fago Bam35. Los rectángulos corresponden a los ORF predichos en el genoma Bam35. (B) Modelo de la capsida del virus Bam35, basado en la estructura cristalográfica del *Alfatectivirus* PRD1. (C) Modelo propuesto para la partícula viral Bam35. Representación esquemática de la partícula viral Bam35 en la que se indica la localización propuesta o conocida de cada una de sus proteínas. (Modificado de Berjón-Otero *et al.*, 2017).

La importancia del genoma, resalta a partir de la clasificación de los fagos en torno a su 'estilo de vida', ya que pueden dividirse en varios grupos con respecto al resultado final de la infección, en términos generales, los grupos más importantes son líticos, caracterizados por la eliminación de la bacteria y liberación de la progenie del fago, así como lisogénicos, los cuales tienen una capacidad lítica pero también 'templada', en la cual, el fago integra su ADN en el ADN de la bacteria para convertirse en un profago, volviéndose inactivo y suprimiendo las propiedades antibacterianas típicas que presenta durante el estado lítico. La elección se produce poco después de la infección y depende, en muchos de los casos, de la actividad fisiológica propia de la bacteria (Krylov 2001). Los genes del fago que controlan la vía lítica pueden ser reprimidos por una proteína-represora que se une a regiones específicas del ADN y bloquea la unión de la ARN polimerasa a sitios específicos de los promotores, lo que impide la transcripción de los genes cuyos productos están implicados en la vía lítica.

La identificación temprana del estilo de vida del fago es crucial durante su proceso de selección para emplearse como alternativa terapéutica, ya que se ha demostrado la relación mutualista que existe entre los profagos y las bacterias, en los que se aumenta la capacidad de defensa bacteriana, principalmente por la presencia de enzimas codificadas por los fagos como las integrasas,

aumentando el riesgo de transferencia de genes que ayuden a la bacteria a defenderse y siendo una razón suficiente para evitar este tipo de fagos en la terapia, ya que, la transferencia horizontal de genes del fago al huésped y viceversa está bien documentada (Canchaya *et al.*, 2003) Así como las integrasas, existen elementos genéticos adicionales que tras su identificación, descalifican a los fagos para ser utilizados como agentes terapéuticos, entre ellos, genes que codifican factores de virulencia y resistencia bacteriana, toxinas o elementos transductibles. Tanto la virulencia como el estilo de vida, pueden ser evaluados por técnicas experimentales y la presencia o ausencia de genes que promuevan la resistencia bacteriana, por técnicas computacionales.

Una de las primeras herramientas empleada para la análisis de estilo de vida del fago fue PHACTS (Phage Classification Tool Set), clasificando al bacteriófago en lítico o lisogénico dependiendo de su proteoma (Ladner *et al.*, 2014), así como PhageAI (Tynecki *et al.*, 2020), utilizando la mayor cantidad de genomas de fagos disponibles en bases de datos y clasificando entre lítico o lisogénico a partir del genoma completo, empleando técnicas más avanzadas de clasificación basadas en aprendizaje automático. Por su parte, la identificación de genes de resistencia, puede llevarse a cabo, tras una comparación del genoma completo contra bases de datos especializadas en genes de resistencia; CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Alcock *et al.*, 2020) y VFDB (Virulence Factor Database) (Chen *et al.*, 2005) son dos ejemplos, que permiten la identificación de genes determinantes de resistencia y antibióticos asociados. Por estas, y otras razones, la secuenciación del genoma completo se ha convertido en obligatorio para la aprobación reglamentaria de cualquier aplicación sanitaria o alimentaria de fagos o sus derivados (Hagens *et al.*, 2010). Ya que, además de que los fagos líticos o las enzimas que producen, son las ideales para la terapia génica, la única forma de utilizar fagos lisogénicos, sería a partir de técnicas modernas de ingeniería genética o biología sintética, convirtiendo al fago en no-lisogénico, bloqueando o eliminando al gen que codifica para la integrasa y otros elementos genéticos no deseados (Monteiro *et al.*, 2019) Lo que podría suponer una nueva estrategia para explorar el uso de fagos templados para la terapia contra las infecciones bacterianas.

2.1 La búsqueda de los mejores candidatos

Desde 1977, a partir del primer genoma completo del bacteriófago $\Phi \times 174$, la secuenciación e identificación de los nuevos fagos ha incrementado numerosamente durante las últimas dos décadas, por lo que los investigadores actuales se enfrentan a una variedad de plataformas de secuenciación y opciones de ensamblaje, así como la gran cantidad de datos que producen (17). La secuenciación de próxima generación se ha convertido en el método preferido para la secuenciación de los fagos, principalmente por su costo por base y el resultado de alta calidad comparado con otras plataformas. Philipson *et al* (2018) han propuesto una guía mínima basada en sus investigaciones para la evaluación de los fagos que pretenden ser administrados en la terapia, incluyendo (i) la obtención de un genoma completo de alta calidad, (ii) identificación de los marcos de lectura abierto (ORF), la anotación de los genes con una función en consenso comprobado por diferentes herramientas, (iv) la identificación de marcadores genéticos deletéreos, (v) la verificación de que el genoma es representativo para la población y finalmente (vi) el análisis de posibles contaminantes (figura 5). Considerando, además, los retos de manejo y secuenciación de las muestras, por ejemplo, los fagos (especialmente líticos), tienen genomas notoriamente metilados porque las bacterias poseen sistemas de modificación y restricción para salvaguardar la integridad de sus genomas de ADN invasor. Incluso, una gran parte de los genomas de los fagos, contienen estructuras complejas como repeticiones directas o invertidas que son problemáticas para el ensamblaje.

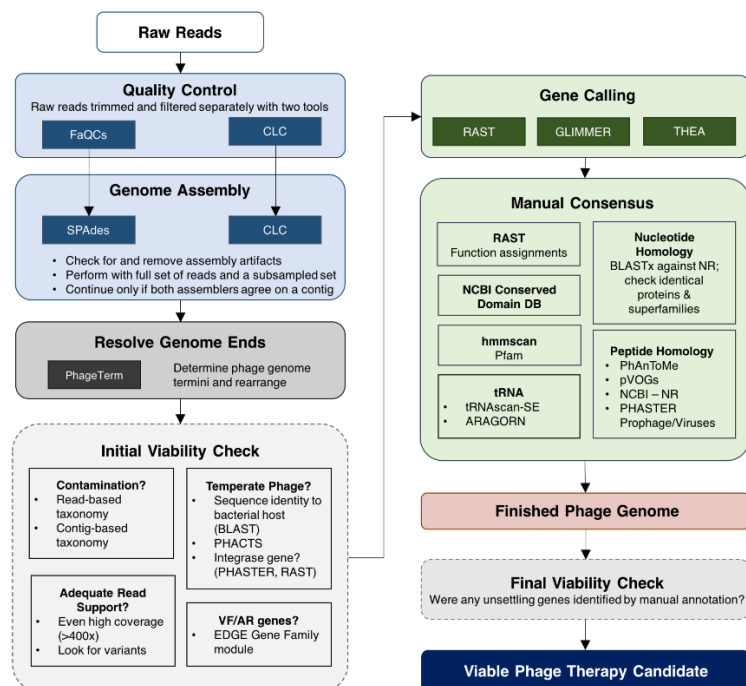


Figura 5. Flujo de trabajo de caracterización de fagos. Esta canalización es una representación simplificada de herramientas y métodos utilizados para obtener genomas de fagos de alta calidad que se consideran candidatos viables para la terapia de fagos. La canalización comienza con lecturas secuenciadas en Illumina. Para reducir el sesgo potencial introducido por las herramientas bioinformáticas, el control de calidad y el ensamblaje del genoma se llevan a cabo utilizando dos pipelines en paralelo. La secuencia final del genoma se obtiene después de resolver los extremos del genoma. Los puntos de control de viabilidad clave están delineados con bordes discontinuos. En el control de viabilidad inicial, los fagos se evalúan en busca de genes problemáticos (resistencia a los antimicrobianos (AMR), factores de virulencia (FV), toxinas) y estilo de vida. Si un candidato pasa la verificación de viabilidad inicial, se aplica un enfoque combinatorio para identificar marcos de lectura abiertos seguido de una anotación manual rigurosa. Se realiza una verificación final después de completar la anotación. Los candidatos a fagos que pasan el punto de control final se consideran seguros para su uso potencial uso. Tomado de Philipson *et al.*, (2018)

Dentro las tecnologías que han sido empleadas para la secuenciación, se encuentran Sanger, Illumina, PacBio y Nanopore, con lecturas desde los 150 hasta 60 mil pb, aumentando o disminuyendo su error dependiendo de la técnica utilizada. Estas plataformas de secuenciación difieren principalmente en su composición química, pero en general se basan en los mismos tres pasos: preparación de la biblioteca, amplificación y secuenciación del dsDNA. En el caso de los fagos de ARN, el ADN complementario (ADNc) debe ser generarse mediante transcripción inversa, ya sea antes del paso de preparación de la biblioteca o utilizando kits que están optimizados para la secuenciación de ARN y pueden proporcionar información sobre si el genoma está formado por dsRNA o ssRNA (Loman *et al.*, 2012).

Tras la obtención de un genoma completo de alta calidad, múltiples herramientas pueden ser utilizadas para el ensamblaje y la identificación de los marcos de lectura abierto; Spades (19),

Unicycler (Wick *et al.*, 2017), y Velvet (Zerbino 2010), basados en Gráfico de Bruijn, son ejemplos de ensambladores. GeneMark (Besemer & Borodovsky 2005), Glimmer (Delcher *et al.*, 2007), y Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), son parte de los algoritmos de predicción de genes más empleados para procariotas, basados en la mejora de la predicción de la estructura del gen, reconocimiento del sitio de iniciación de la traducción y reducción de los falsos positivos. La anotación, además de proporcionar información sobre genes no deseados como las integrasas, han permitido identificar genes específicos utilizados por herramientas taxonómicas, como los genes estructurales de la cápside viral (Sullivan *et al.*, 2008). Herramientas adicionales que permiten una predicción y anotación automática como Prokka (Seemann 2014) han facilitado el manejo de datos genómicos. Cada una de estas herramientas pueden utilizarse a través de su interfaz web, utilizando plataformas como Galaxy (Jalili *et al.*, 2020) o a través de la línea de comandos en Linux. Para cualquier método de predicción, es recomendable una curación manual de los genes y proteínas que conforman el genoma, a fin de asegurar la reducción de errores, que terminan en bases de datos públicas (Figura 6).

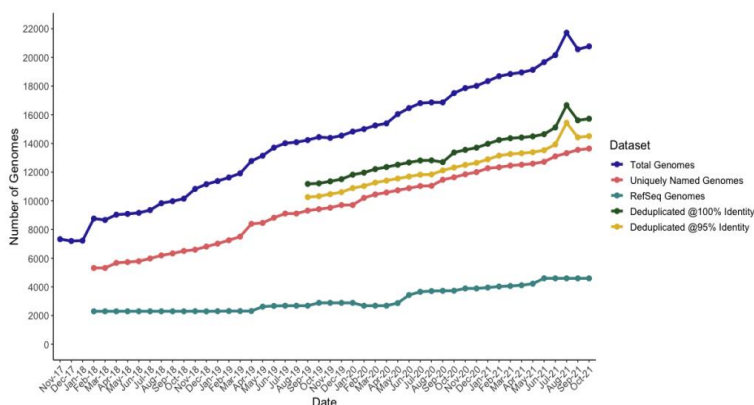


Figura 6. Identificación de sesgos a gran escala en la colección actual de genomas de fagos cultivados figura Tomada de <http://millardlab.org/>

2.2 Diversidad genómica y metagenómica viral

2.2.1 Número de genomas completos

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), hay 8.437 genomas de fagos completos divididos en 12 familias (según la clasificación de ICTV en ese momento) y un grupo no clasificado (figura 7a). En esta base de datos podemos encontrar que más de la mitad de ellos son miembros de la familia *Siphoviridae*. Esta sobrerrepresentación se debe en gran parte al aislamiento y secuenciación del genoma de 1.537 sifófagos que infectan a *Mycobacterium*

smegmatis del programa SEA-PHAGES (Alianza de Educación Científica-Cazadores de Fagos en Genómica Avanzada y Ciencia Evolutiva) (Tuajuanda *et al.* 2014). *Myoviridae* y *Podoviridae* representan el 17% y el 12% del total de fagos, respectivamente, lo que hace que *Caudovirales* (que también comprende *Herelleviridae* y *Ackermannviridae*) sea el grupo de fagos más abundante (> 85%) en las bases de datos genómicas públicas.

Esta representación tan desproporcionada de fagos de dsDNA probablemente disminuirá pronto debido a la presencia nuevos fagos. Por ejemplo, el grupo de virus bacterianos no clasificados dentro de la base de datos del NCBI consiste en fagos descubiertos a través de proyectos metagenómicos que aún no se han aislado o que se han propagado muy recientemente en un hospedador bacteriano. Parte de este último grupo incluye 283 fagos de dsDNA sin cola, que infectan a la omnipresente familia bacteriana *Vibrionaceae* (Kauffman, *et al.* 2018).

2.2.2 Rango de genoma

Los fagos tienen una amplia gama de tamaños de genomas (figura 7b). Hasta ahora, el genoma más pequeño informado hasta la fecha es el del fago L5 de *Leuconostoc*, con solo 2.435 pb. En el otro extremo del espectro, se está caracterizando un número cada vez mayor de fagos jumbo (> 200 kb) que muestran características genómicas únicas 58. Su gran tamaño de genoma permite que los fagos jumbo porten genes involucrados en la replicación y el metabolismo de nucleótidos que están ausentes en los más pequeños genomas de fagos. Por ejemplo, el jumbo fago vB_Pd_PDCC-1 el cual tiene un tamaño de 237 509 bp, el cual presenta organización atípica porque los genes con funciones asociadas no muestran una sintenia fuerte y, en cambio, están más dispersos (Veyrand-Quirós *et al.* 2020). Finalmente, un nuevo grupo de fagos con los genomas más grandes jamás registrados hasta la fecha, llamados megafagos (> 540 kb), fueron descubiertos son ubicuos y se describen a partir de una variedad de microbiomas que van desde el intestino de los animales hasta el suelo y los sistemas de agua dulce. Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún megafago marino completo. Sin embargo, uno de estos genomas incluía un nuevo megafago, Mar_Mega_1 de > 650 Kb, lo que lo convierte en uno de los genomas de fagos más grandes reunidos hasta la fecha. Utilizando enfoques filogenéticos y de red. El análisis genómico mostró que Mar_Mega_1 comparte relativamente pocos homólogos con sus parientes más cercanos, pero, al igual que con otros megafagos, Mar_Mega_1 contenía una variedad de genes metabólicos auxiliares responsables del metabolismo del carbono y la biosíntesis de nucleótidos, incluida una isocitrato

deshidrogenasa (Idh) dependiente de NADP y nicotinamidenucleótido amidohidrolasa (PncC), que no se han identificado previamente en megafagos. Mar_Mega_1 fue abundante en una muestra de viroma marino y los fagos relacionados son muy frecuentes en los océanos (Slawomir *et al.* 2021).

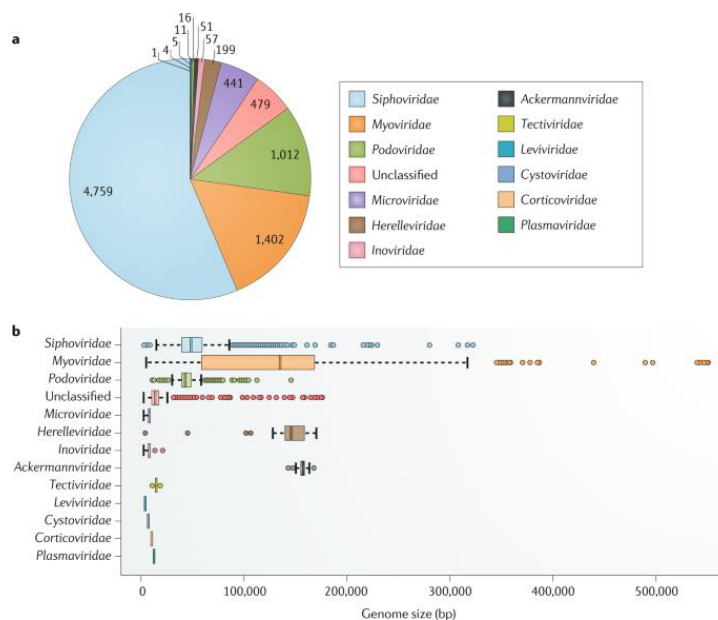


Figura 7 Número de genomas completos y distribución del tamaño del genoma en familias de fagos. Se muestra el número de genomas completos (a) y la distribución del tamaño del genoma (b) en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a septiembre de 2019. La asignación de cada fago a una familia se realizó utilizando la base de datos de taxonomía NCBI. El grupo no clasificado combina "Caudovirales no clasificados", "fagos de ADN bicatenario no clasificados" y "virus bacterianos no clasificados". Este grupo no clasificado es el cuarto más grande, lo que enfatiza el creciente número de fagos descubiertos a través de la metagenómica viral para los cuales no se puede asignar una familia en base a la información de la secuencia. Entre el orden Caudovirales, Herelleviridae y Ackermannviridae son las familias más homogéneas en términos de tamaño del genoma. Lo más probable es que esto se deba a que estas dos familias se crearon después de análisis genómicos en lugar de similitudes morfológicas. Tomado de Moira *et al.* (2020).

3. Conclusión

La mayoría de los fagos, destinados a la terapia con fagos, por lo regular se aíslan mediante variaciones del protocolo de enriquecimiento clásico. Se aísla un subconjunto de fagos usando una mezcla de hospedadores con la intención de obtener fagos de rango de hospedador más amplio y se han desarrollado varios protocolos específicamente para seleccionar fagos con rango de hospedador aumentado o fagos polivalentes. Si bien la mayoría de los grupos usan métodos que se basan en el crecimiento de fagos para probar el rango de hospedadores, todavía hay algunos que confían solo en pruebas puntuales menos precisas, pero fáciles de realizar. Uno de los desafíos con la caracterización posterior al aislamiento son los métodos automatizados para la investigación sistemática de los fagos y otros elementos móviles de ADN en las secuencias del genoma bacteriano disponibles para comprender su papel en la evolución del genoma bacteriano. Esto debido al contenido de nucleótidos y genes que son extremadamente diversos en los genomas de fagos, los cuales pueden estar interconectados desde una perspectiva evolutiva y varios factores que impulsan tasas altas o bajas de intercambio de genes. En esta revisión, hemos destacado que la investigación de fagos será fundamental para comprender su aplicación durante la fagoterapia, impactando en el desarrollo de una acuicultura más sustentable. El éxito dependerá en gran medida de enfoques multidisciplinarios integradores en un campo que, hasta hace poco, ha estado dominado por el pensamiento reduccionista.

5. Bibliografía

- Abedon, S.T. (2011). Lysis from without. *Bacteriophage* 1:46–49.
- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152, 227–243.
- Adams Michael J., Elliot J. Lefkowitz, Andrew M. Q. King, Balázs Harrach, Robert L. Harrison, Nick J. Knowles, Andrew M. Kropinski, Mart Krupovic, Jens H. Kuhn, Arcady R. Mushegian, Max L. Nibert, Sead Sabanadzovic, H el ene Sanfa on, Stuart G. Siddell, Peter Simmonds, Arvind Varsani, Francisco Murilo Zerbini, Richard J. Orton, Donald B. Smith, Alexander E. Gorbalenya & Andrew J. Davison. (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Arch. Virol.* 162, 1441–1446
- Alagappan, K.M., B. Deivasigamani, S.T. Somasundaram & S. Kumaran. (2010). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Specific Phages from Shrimp Ponds in East Coast of India. *Current microbiology*, 61(4), 235-240.
- An Sung Kwon, Bong Jo Kang, Soo Youn Jun, Seong Jun Yoon, Jae Hwan Lee, & Sang Hyeon Kang. (2017). Evaluating the effectiveness of *Streptococcus parauberis* bacteriophage Str-PAP-1 as an environmentally friendly alternative to antibiotics for aquaculture. *Aquaculture*. 468 (1) 464-470.
- Baek, M.S., Y.S. Hwang & S. Choi. (2013). Mixture of *Edwardsiella tarda* specific Bacteriophage and *Bacillus subtilis* KM-1enhanced bactericidal activity against *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.* 26(3), 185-191.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 19(5), 455–477.
- Bastian Barker, Rasmussen, Panos G. Kalatzis, Mathias Middelboe, & LoneGram. (2019). Combining probiotic *Phaeobacter inhibens* DSM17395 and broad-host-range vibriophage KVP40 against fish pathogenic vibrios. *Aquaculture*. 513, 734415.
- Besemer, J., & Borodovsky, M. (2005). GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. *Nucleic acids research*, 33(Web Server issue), W451–W454.
- Binetti, A.G., Quiberoni, A. & Reinheimer, J.A., (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Res. Int.*, 35(1), 73–83.
- Borody, T.J. & A. Khoruts. 2012. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 88–96.
- Breitbart, M. (2012). Marine viruses: truth or dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4: 425-448.
- Breitbart, M. 2012. Marine viruses: truth or dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4: 425--448.
- Brian P Alcock, Amogelang R Raphenya, Tammy T Y Lau, Kara K Tsang, M egane Bouchard, Arman Edalatmand, William Huynh, Anna-Lisa V Nguyen, Annie A Cheng, Sihan Liu, Sally Y Min, Anatoly Miroshnichenko, Hiu-Ki Tran, Rafik E Werfalli, Jalees A Nasir, Martins Oloni, David J Speicher, Alexandra Florescu, Bhavya Singh, Mateusz Faltny, Anastasia Hernandez-Koutoucheva, Arjun N Sharma, Emily Bordeleau, Andrew C

- Pawlowski, Haley L Zubyk, Damion Dooley, Emma Griffiths, Finlay Maguire, Geoff L Winsor, Robert G Beiko, Fiona S L Brinkman, William W L Hsiao, Gary V Domselaar & Andrew G McArthur. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1), D517–D525.
- Buckingham SD. (2010). Next Generation Data Explosion. *Lab Times.*;1:52–3.
- Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dilmann ML & Brussow H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* 6: 417-424. 10.1016/S1369-5274(03)00086-9
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D325–D328.
- Chibani--Chennoufi, S., A. Bruttin, M.L. Dillmann & H. Brüssow. 2004. Phage--host interaction: an ecological perspective. *Journal of bacteriology*, 186(12): 3677-- 3686.
- Comeau, A.M., A.M. Chan & C.A. Suttle. (2006). Genetic richness of vibriophages isolated in a coastal environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1164–1176.
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C., & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(6), 673–679.
- Dion, M.B., Oechslin, F. & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Berekzi, N. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9, 50.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. & Berekzi, N. 2017. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9, 50.
- Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska--Skrobek, B. Maciejewska, A.S. Delattre & R. Lavigne. 2012. Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage--encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 699– 722.
- Drulis-Kawa, Z., G. Majkowska-Skrobek, B. Maciejewska, A.S. Delattre & R. Lavigne. (2012). Learning from bacteriophages—advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 699– 722.
- Egan, S. & M. Gardiner. 2016. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. *Frontiers in microbiology*, 7, 991.
- Faith, J.J., F.E. Rey, D. O'donnell, M. Karlsson, N.P. McNulty, G. Kallstrom, A.L. Goodman & J.I. Gordon. 2010. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *The ISME journal*, 4(9), 1094.
- FAO (2019a). A Quarterly Update on World Seafood Markets April 2019 Issue,with January–December 2018 Statistics. Available online at: <http://www.fao.org/3/ca5307en/ca5307en.pdf>
- FAO(2019b). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 (SOFIA). Available online at: <http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf>
- Fennema, O.R. (1996) *Food Chemistry*, 3rd edn. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc.

- Flores, V., C. Fernández & M. Medina, (2019). Aislamiento y evaluación de la efectividad de bacteriófagos aislados de ambiente marino y su efecto en el control del crecimiento bacteriano. *Boletín Instituto del Mar de Perú* 34 (1): 151-164.
- Forterre, P. & D. Prangishvili. 2009. The origin of viruses. *Research in microbiology*, 160(7): 466-472.
- Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD & Vinje J. (2009). Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae) *J Virol.*;83:11233–11243.
- Gill, J. J., Sabour, P., & Griffiths, M. (2010). “Practical and theoretical considerations for the use of bacteriophages in food systems,” in *Bacteriophages in the Control of Food-and Waterborne Pathogens*, eds P. Sabour and M. Griffiths (Washington, DC: ASM Press), 217–235.
- Gon Choudhury, T., V.T. Nagaraju, S. Gita, A. Paria & J. Parhi. 2017. Advances in Bacteriophage Research for Bacterial Disease Control in Aquaculture, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1--13
- Gordillo Altamirano, F., Forsyth, J.H., Patwa, R. Kostoulias, X., Trim, M, Subedi, D., Archer, S.K., Morris, F.C., Oliveira, C., KIELTY, L., Korneev, D., O’bryan, M.K., Lithgow, T.J., Peleg, A.Y. & Barr, J.J. (2021). Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nat Microbiol* 6, 157–161
- Huang, C., Y. Zhang & N. Jiao. (2010). Phage resistance of a marine bacterium, *Roseobacter denitrificans*. *Curr. Microbiol.*, 61:141–47
- Hagens S & Loessner MJ. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol.*;11:58–68.
- Monteiro R, Pires DP, Costa AR & Azeredo J. (2019). Phage therapy: going temperate? *Trends Microbiol* 27:368–378.
- Hanlon, G.W. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128.
- Hongyu Ren, Zhen Li, Yongping Xu, Lili Wang & Xiaoyu Li. (2019). Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio parahaemolyticus* infection of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*. 530, 322-329.
- Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119.
- Hyman P, & Abedon ST. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*. 70: 217–248.
- Jalili, V., Afgan, E., Gu, Q., Clements, D., Blankenberg, D., Goecks, J., Taylor, J., & Nekrutenko, A. (2020). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic acids research*, 48(W1), W395–W402.
- Jepson, C.D., & March, J.B. (2004) Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 22:2413–2419.
- Jin Woo Juna, Jee Eun Hanb, Kathy F.J. Tangb, Donald V. Lightnerb, Jaehoon Kimc, Sang Won Seoc, & Se Chang Parka. (2016). Potential application of bacteriophage pVp-1: Agent combating *Vibrioparahaemolyticus* strains associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Aquaculture*. 457 (20) 100-103.

- Junkai Zhu, Mengya Xu, Qiqin Liu, Dengfeng Li, Rui Yang & Haimin Chen. (2021). Bacteriophage therapy on the conchocelis of *Pyropia haitanensis* (Rhodophyta) infected by *Vibrio mediterranei* 117-T6. *Aquaculture* 531 735853
- Kalatzis, P.G., R. Bastías, C. Kokkari & P. Katharios. (2016). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, ϕ St2 and ϕ Grn1; Phage Therapy Application for Biological Control of *Vibrio alginolyticus* in Aquaculture Live Feeds. *PLoS ONE* 11(3): e0151101.
- Kauffman Kathryn M , Fatima A Hussain, Joy Yang, Philip Arevalo, Julia M Brown, William K Chang, David VanInsberghe, Joseph Elsherbini, Radhey S Sharma, Michael B Cutler, Libusha Kelly & Martin F Polz. (2018). A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature* 554, 118–122.
- Khan-Mirzaei M. & A.S. Nilsson. (2015). Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One*, 10(3):e0118557.
- Kim, H. J., Jun, J. W., Giri, S. S., Chi, C., Yun, S., Kim, S. G., & Park, S. C. (2018). Complete Genome Sequence of a Bacteriophage, pVco-5, That infects *Vibrio coralliilyticus*, which causes bacillary necrosis in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Genome announcements*, 6(2), e01143-17.
- Kim, J.S., A. Hosseindoust, S.H. Lee, Y.H. Choi, M.J. Kim, J.H. Lee, I.K. Kwon, & B.J. Chae. (2017). Bacteriophage cocktail and multi-strain probiotics in the feed for weanling pigs: effects on intestine morphology and targeted intestinal coliforms and *Clostridium*. *Animal*, 11(1), 45-53.
- Kim, K.H., S.L. Ingale, J.S. Kim, S.H. Lee, J.H. Lee, I.K. Kwon & B.J. Chae. (2014). Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. *Anim. Feed Sci. Tech.* 196, 88-95.
- Knies, J. L., Kingsolver, J. G., & Burch, C. L. (2009). Hotter is better and broader: thermal sensitivity of fitness in a population of bacteriophages. *The American Naturalist*, 173(4), 419-430.
- Krylov, V. N. (2001). *Russian Journal of Genetics*, 37(7), 715–730.
- Kumarappan Alagappan, Valliappan Karuppiah, & Balaraman Deivasigamani. (2016). Protective effect of phages on experimental *V. parahaemolyticus* infection and immune response in shrimp (Fabricius, 1798). *Aquaculture*. 453 (20), 86-92
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. (2004). *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press. Florida, EEUU. 485 p.
- Kutter, E. & A. Sulakvelidze. 2004. *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press. Florida, EEUU. 485 p.
- Labrie, S.J., J.E. Samson & S. Moineau. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 317–327
- Ladner Jason T, Brett Beitzel, Patrick S G Chain, Matthew G Davenport, Eric F Donaldson, Matthew Frieman, Jeffrey R Kugelman, Jens H Kuhn, Jules O'Rear, Pardis C Sabeti, David E Wentworth, Michael R Wiley, Guo-Yun Yu, Threat Characterization Consortium; Shanmuga Sozhamannan, Christopher Bradburne & Gustavo Palacios. (2014). Standards for sequencing viral genomes in the era of high-throughput sequencing. *MBio* , 5, e01360-14
- Lenski, R.E. & B.R. Levin. (1985). Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *American Naturalist*, 585-602.

- Lenski, R.E. & B.R. Levin. 1985. Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: a model, some experiments, and predictions for natural communities. *American Naturalist*, 585--602.
- Li, Z., J. Zhang, X. Li, X. Wang, Z. Cao, L. Wang, & Y. Xu. (2016). Efficiency of a bacteriophage in controlling *Vibrio* infection in the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 451, 345-352.
- Li, Z., Song, Y., Wang, X., Zhang, J., Wang, L., Li, X., & Xu, Y. (2017). Using Phage PSM-1 to Control *Shewanella marisflavi* Infection in Juvenile Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 48(1), 113-121.
- Loman Nicholas J , Raju V Misra, Timothy J Dallman, Chrystala Constantinidou, Saheer E Gharbia, John Wain, Mark J Pallen. (2012). Performance comparison of benchtop highthroughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 30:434–439.
- Lomelí-Ortega, C. O., Martínez-Sández, A. J., Barajas-Sandoval, D. R., Reyes, A. G., Magallón-Barajas, F., Veyrand-Quiros, B., & Quiroz-Guzmán, E. (2021). Isolation and characterization of vibriophage vB_Vc_SrVc9: an effective agent in preventing *Vibrio campbellii* infections in brine shrimp nauplii (*Artemia franciscana*). *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 36-49.
- Lomelí-Ortega, C.O. & S.F. Martínez-Díaz. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211.
- Marietto-Gonçalves, G.A., E.T. Lima, T.C. Donato, T.S. Rocha, L.E. Cisneros-Álvarez, J. Lopes-Sequeira & R.L. Andreatti-Filho. (2011). Eradication of *Salmonella typhimurium* in broiler chicks by combined use of P22 bacteriophage and probiotic. *Int. J. Microbiol. Res.* 3(2), 4-9.
- Martinez-Diaz, S. F. & A. Hipólito-Morales. (2013). Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400, 120-124.
- Matsuoka, S., Hashizume, T., Kanzaki, H., Iwamoto, E., Park, S. C., Yoshida, T., & Nakai, T. (2007). Phage therapy against β -hemolytic streptococcosis of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.
- Michniewski S., Branko Rihtman, Ryan Cook, Michael A. Jones, William H. Wilson, David J. Scanlan & Andrew Millard. (2021). A new family of “megaphages” abundant in the marine environment. *ISME COMMUN.* 1, 58 *Microbiol.*, 5: 801-812.
- Middelboe, M. & P. Lyck. (2002). Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27:187–94
- Middelboe, M. & P. Lyck. 2002. Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, 27:187–94
- Middelboe, M., K. Holmfeldt, L. Riemann, O. Nybroe & J. Haaber. (2009). Bacteriophages drive strain diversification in a marine Flavobacterium: implications for phage resistance and physiological properties. *Environ. Microbiol.*, 11:1971–82
- Moïra B. Dion, Frank Oechslin and Sylvain Moineau. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol* 18, 125–138
- Obeng, N., A.A. Pratama, & J.D. van Elsas. (2016). The significance of mutualistic phages for bacterial ecology and evolution. *Trends in microbiology*, 24(6): 440- 449.

- Pal, S. 2015. Phage Therapy an alternate disease control in Aquaculture: A review on recent advancements. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 8(9): 68-81.
- Patil, J.R., S.N. Desai, P. Roy, M. Durgaiyah, R.S. Saravanan, & A. Vipra. (2014). Simulated hatchery system to assess bacteriophage efficacy against *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Organ.* 112: 113–119
- Pereira, C., Moreirinha, C., Teles, L., Rocha, R. J., Calado, R., Romalde, J. L., & Almeida, A. (2017). Application of phage therapy during bivalve depuration improves *Escherichia coli* decontamination. *Food microbiology*, 61, 102-112.
- Philipson, C. W., Voegtly, L. J., Lueder, M. R., Long, K. A., Rice, G. K., Frey, K. G., Biswas, B., Cer, R. Z., Hamilton, T., & Bishop-Lilly, K. A. (2018). Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses*, 10(4), 188.
- Pirisi, A. (2000) Phage therapy – advantages over antibiotics? *The Lancet* 356: 1418.
- Pope, W. H., Haase-Pettingell, C., & King, J. (2004). Protein folding failure sets high-temperature limit on growth of phage P22 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4840-4847.
- Quiroz-Guzmán Eduardo, Peña-Rodríguez Alberto, Vázquez-Juárez Ricardo, Barajas-Sandoval Diana R., Balcázar José L. & Martínez-Días Sergio F. (2018). Bacteriophage cocktails as an environmentally-friendly approach to prevent *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* infections in brine shrimp (*Artemia franciscana*) production. *Aquaculture*. 492. (1), 273-279.
- Quiróz-Guzman, E. (2013). Control de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi* durante la producción de nauplios de *Artemia franciscana* mediante un consorcio de bacterias probióticas y fagos. Tesis de doctorado. CICIMAR-IPN. México. 198 p.
- Rakhuba, D.V., E.I. Kolomiets, D.E Szwajcjer & G.I. Novik. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish J Microbiol.* 59: 145–155.
- Raya, R.R. & E.M. Hébert. (2009). Isolation of phage via induction of lysogens, p 23–32. En: Clokie MRJ, Kropinski AM (ed), *Bacteriophages: methods and protocols*, vol 1. Isolation, characterization, and interactions. Reino Unido. 313 p.
- Roberfroid, M., G.R. Gibson, L. Hoyles, A.L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, MJ. Davicco, L. Léotoing, Y. Wittrant, N. Delzenne, P.D. Cani, A.M. Neyrinck, & A. Meheust. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), S1--S63.
- Roossinck, M.J. 2015. Move over bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. *J Virol.*, 89:6532–6535
- Rørbo, N., Rønneseth, A., Kalatzis, P. G., Rasmussen, B. B., Engell-Sørensen, K., Kleppen, H. P., & Middelboe, M. (2018). Exploring the effect of phage therapy in preventing *Vibrio anguillarum* infections in cod and turbot larvae. *Antibiotics*, 7(2), 42.
- Salazar-Llanos, C. V., (2018). Aislamiento y determinación del rango de hospedero de bacteriófagos de *Salmonella* spp. Memoria Profesional. Universidad de Chile, Santiago, Chile: 1-26 p.

- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(14), 2068–2069.
- Sheth, R.U., V. Cabral, S.P. Chen, & H.H. Wang. 2016. Manipulating bacterial communities by in situ microbiome engineering. *Trends in Genetics*, 32(4), 189-200.
- Silva, Y. J., Costa, L., Pereira, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N. C., & Almeida, A. (2014b). Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microbial biotechnology*, 7(5), 401-413.
- Silva, Y.J., L. Costa, C. Pereira, C. Mateus, A. Cunha, R. Calado, N.C. Gomes, M.A. Pardo, I. Hernandez & A. Almeida. (2014a). Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS ONE*, 9 (12): e114197.
- Slawomir Michniewski, Branko Rihtman, Ryan Cook, Michael A. Jones, William H. Wilson, David J. Scanlan & Andrew Millard. (2021) A new family of “megaphages” abundant in the marine environment. *ISME COMMUN.* 1, 58
- Stalin, N. & P. Srinivasan. 2016. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phage from shrimp pond in Palk Strait, South East coast of India. *Biologicals*, 44(6), 526-533.
- Stoddard, L.I., J.B. Martiny & M.F. Marston. (2007). Selection and characterization of cyanophage resistance in marine *Synechococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(17): 5516-5522.
- Suttle, C.A. 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057): 356-361.
- Sullivan MB, Coleman ML, Quinlivan V, Rosenkrantz JE, Defrancesco AS, Tan G, Fu R, Lee JA, Waterbury JB, Bielawski JP, Chisholm SW. (2008). Portal protein diversity and phage ecology. *Environ Microbiol.* 10(10):2810-23.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361
- Suttle, C.A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Rev.*
- Tuajuanda C. Jordan, Sandra H. Burnett, Susan Carson, Steven M. Caruso, Kari Clase, Randall J. DeJong, John J. Dennehy, , Dee R. Denver, David Dunbar, Sarah C. R. Elgin, Ann M. Findley, Chris R. Gissendanner, Urszula P. Golebiewska, Nancy Guild, Grant A. Hartzog, Wendy H. Grillo, Gail P. Hollowell, Lee E. Hughes, Allison Johnson, Rodney A. King, Lynn O. Lewis, Wei Li, Frank Rosenzweig, Michael R. Rubin, Margaret S. Saha, James Sandoz, Christopher D. Shaffer, Barbara Taylor, Louise Temple, Edwin Vazquez, Vassie C. Ware, Lucia P. Barker, Kevin W. Bradley, Deborah Jacobs-Sera, Welkin H. Pope, Daniel A. Russell, Steven G. Cresawn, David Lopatto, Cheryl P. Bailey & Graham F. (2014). A Broadly Implementable Research Course in Phage Discovery and Genomics for First-Year Undergraduate Students. *mBio* 5(1):e01051-13.
- Tynecki Piotr, Arkadiusz Guziński, Joanna Kazimierczak, Michał Jadczyk, Jarosław Dastyk & Agnieszka Onisko. (2020). PhageAI - Bacteriophage Life Cycle Recognition with Machine Learning and Natural Language Processing. *bioRxiv*.
- Veyrand-Quirós B. Gómez-Gil B., Lomeli-Ortega C.O., Escobedo-Fregoso C., Millard A.D., Tovar-Ramírez D., Balcázar J.L., & Quiroz-Guzmán E. (2020). Use of bacteriophage vB_Pd_PDCC-1 as biological control agent of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* during hatching of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) eggs. *J Appl Microbiol* 129:1497–1510.

- Vorobey, E.S., O.S. Voronkova & A.I. Vinnikov. (2017). Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics. *Regul. Mech. Biosyst.* 8(2), 252-258.
- Walakira, J. K., (2008). Discovery, isolation and characterization of bacteriophages specific for *Edwardsiella ictaluri*. Tesis de Maestría. Auburn University, Alabama, USA 80 p.
- Wang, Y., M. Barton, L. Elliott, X. Li, S. Abraham, M. O'Dea, & J. Munro, J. (2017). Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). *Aquaculture* 473, 251-258.
- Wang, Y.B., J.R. Li & J. Lin. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281: 1-4.
- Weinbauer, M.G. & P. Peduzzi. (1995). Effect of virus-rich high molecular weight concentrates of seawater on the dynamics of dissolved amino acids and carbohydrates. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 127(1): 245-253.
- Wichels A, Biel SS, Gelderblom HR, Brinkhoff T, Muyzer G & Schutt CH (1998) Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 64:4128–4133
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595.
- Wittebole, X., S. De Roock & S.M. Opal. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens, *Virulence*, 5:1, 226--235.
- Wittebole, X., S. De Roock & S.M. Opal. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens, *Virulence*, 5:1, 226--235.
- Woo, J. & J. Ahn. (2014). Assessment of synergistic combination potential of probiotic and bacteriophage against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to simulated intestinal conditions. *Arch Microbiol.* 196(10), 719-727.
- Wu Liting, Yuan Tian, Pang Maoda, Yang Zhenquan, Bao Hongduo, Shou Yan, Sun Lichang, Wang Ran & Zhang Hui. (2021). A novel vibriophage vB_VhaS_PcB-1G capable of inhibiting virulent *Vibrio harveyi* pathogen. *Aquaculture* 542, 736854.
- Yanhui Wang, Mary Barton, Lisa Elliott, Xiaoxu Li, Sam Abraham, Mark O' Dea, & James Munro. (2017). Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevis*). 473 (20), 251-258.
- Yolanda J. Silva, Catarina Moreirinha, Carla Pereira, Liliana Costa, Rui J. M. Rocha, Ângela Cunha, Newton C. M. Gomes, Ricardo Calado, & Adelaide Almeida. (2016). Biological control of *Aeromonas salmonicida* infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with Phage AS-A. *Aquaculture*. 450 (1) 225-233.
- Zerbino D. R. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 11, Unit–11.5.
- Zhang, J., Z. Cao, Z. Li, L. Wang, H. Li, F. Wu, L. Jin, X. Li, S. Li & Y. Xu. (2015). Effect of bacteriophages on *Vibrio alginolyticus* infection in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(2), 149-158.

Zhen Li, Hongyu Ren, Qiang Li, Bilal Murtaz, Xiaoyu Li, Jiancheng Zhang, & Yongping Xu. (2020). Exploring the effects of phage cocktails in preventing *Vibrio* infections in juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) farming. *Aquaculture*. 515, 734599.