



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL BACTERIÓFAGO
vB_Vp_PvVp04 EN LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA
DE *Vibrio parahaemolyticus*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Alexis Sebastián Martínez López

La Paz, Baja California Sur, abril de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 18:00 horas del día 06 del Mes de Marzo del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de los efectos del bacteriófago vB_Vp_PvVp04 en la expresión y regulación génica de *Vibrio parahaemolyticus*"

Presentada por el alumno:

Alexis Sebastián Martínez López

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Co-Director de Tesis



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Co-Directora de Tesis



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado
y Formación de Recursos Humanos.



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

CIB Centro de
Investigaciones
Biológicas
del Noroeste

La Paz, Baja California Sur, a 06 de marzo de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Alexis Sebastián Martínez López del Programa de Maestría en ciencias: uso, manejo y preservación de los recursos naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate

- Filtros utilizados:
Excluir citas y bibliografía

- Porcentajes de similitud:
11%

Se muestra captura de pantalla

Evaluación de los efectos del bacteriófago vB_Vp_PVp04 en la expresión y regulación génica de *Vibrio parahaemolyticus*

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	602 palabras — 4%
2	hdl.handle.net Internet	83 palabras — 1%
3	docplayer.es Internet	51 palabras — < 1%
4	www.ainfo.inia.uy Internet	44 palabras — < 1%
5	Peng Luo, Qiting Liu, Yiqin Deng, Yushun Tian, Long Yun, Chaoqun Hu. "Strand-specific RNA-Seq analysis provides first insight into transcriptome response of <i>Vibrio alginolyticus</i> to phage infection", <i>Marine Genomics</i> , 2017 Crossref	41 palabras — < 1%
6	cybertesis.unmsm.edu.pe Internet	41 palabras — < 1%
7	vsip.info Internet	35 palabras — < 1%
8	es.unionpedia.org Internet	34 palabras — < 1%

Firmas del Comité

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Universidad Autónoma de Nuevo León
Co-Directora de Tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co- Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Suplente

Dra. Paola Magallón Servín

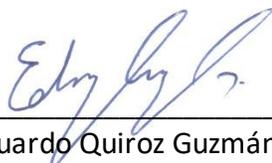
Resumen

El análisis del transcriptoma por RNA-Seq de bacterias durante la infección por fagos ha sido ocasionalmente reportado en los últimos años, sin embargo, se sabe poco sobre cómo responden las bacterias del género *Vibrio* a la invasión fágica a nivel global del transcriptoma. En el presente estudio, se investigó el perfil del transcriptoma de *Vibrio parahaemolyticus* durante una infección lítica con el vibriofago vB_Vp_PvVp04 a través de un análisis de RNA-Seq. Los resultados revelaron que 14 genes aumentaron su transcripción y 34 genes disminuyeron su transcripción durante la infección del fago. Es importante destacar que los genes que aumentaron su transcripción están involucrados en procesos importantes para la bacteria como lo son procesamientos de aminoácidos, metabolismo energético y respuesta a estrés, mientras que en el caso de los que disminuyeron sus transcritos podemos encontrar algunos genes involucrados principalmente en el transporte de sustancias al interior o exterior de la bacteria. Estos datos de transcriptoma contribuyen a una comprensión más completa de la interacción de *Vibrio parahaemolyticus* a la infección por el fago vB_Vp_PvVp04 permitiendo tener un mayor conocimiento de la respuesta de la bacteria durante la infección.

Palabras clave: Bacteriófagos, *Vibrio parahaemolyticus*, RNA-seq

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8688-4891>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Summary

Transcriptome analysis by RNA-Seq of bacteria during phage infection has been occasionally reported in recent years; however, little is known about how bacteria of the *Vibrio* genus respond to phage invasion at the global transcriptome level. In the present study, the transcriptome profile of *Vibrio parahaemolyticus* during a lytic infection with vibriophage vB_Vp_PvVp04 was investigated through RNA-Seq analysis. The results revealed that 14 genes increased their transcription, while 34 genes decreased their transcription during phage infection. Importantly, the upregulated genes are involved in crucial processes for the bacteria such as amino acid processing, energy metabolism, and stress response, whereas the downregulated genes include some involved primarily in substance transport into or out of the bacteria. These transcriptomic data contribute to a more comprehensive understanding of *Vibrio parahaemolyticus* interaction with vB_Vp_PvVp04 phage infection, allowing for a greater insight into the bacteria's response during infection.

Keywords: Bacteriophages, *Vibrio parahaemolyticus*, RNA-seq

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8688-4891>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Eduardo Quiroz Guzmán



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

Dedicatoria

A mi madre y a mis abuelos, que sin su apoyo no habría sido posible llegar tan lejos, a mis hermanos que con tan corta edad han sido motor principal para ser mejor persona y ejemplo para seguir.

Dedico estas palabras aquellos que en momentos de dificultad siguen dedicándose a la investigación, creatividad y creación de conocimiento nuevo, a los nuevos investigadores o aquellos que están en proceso a convertirse en tales ya que sin sus sueños, esperanzas, esfuerzo y resiliencia todo proceso involucrado no sería igual.

Esta tesis es dirigida aquellas personas que tanto como yo, les apasiona la curiosidad y el camino del conocimiento y aprendizaje, sobre todo aquellos que están dispuestos a entregar un granito de arena al conocimiento jerárquico sobre las problemáticas que imperan en la sociedad.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca de Posgrado otorgada durante la realización de esta tesis (Número de beca: 805234).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por permitirme la realización de este trabajo de Maestría. Gracias al personal de cada una de las áreas por su amabilidad y gran ímpetu de trabajo, también por las instalaciones y áreas de trabajo prestadas, sin ello el proceso del Posgrado no sería lo mismo.

Agradezco enormemente a mi madre y mis abuelos por acompañarme en este trayecto siempre, a aquellas personas que estuvieron durante este proceso y a las que conocí, a las enseñanzas dadas por mis compañeros de Laboratorio en Monterrey, UMGE por haberme dado el espacio para aprender técnicas básicas de microbiología desde el inicio de este proyecto, sin su ímpetu por docencia la elaboración de esta tesis hubiera sido distinta.

Agradezco la compañía a distancia siempre de mis roomies Fernanda Hernández y Jaime Silva, el apoyo y sobre todo por escucharme durante el proceso cruzado en el Posgrado.

A mis amigos Carlos Daniel Flores, Juan Manuel Gonzales e Iván Camaño, que siempre estuvieron escuchando a distancia mi travesía en la ciudad de La Paz, BCS. A las personas que conocí en la generación de estudiantes del CIBNOR a la que pertenezco 2021-2023, La ya titulada Mc. Marina Jiménez, el recién Mc. Carlos Aquino, IAB Alonso Tovar, Bióloga Fernanda Manríquez, LBG Jesús Castro, gracias por aquellos momentos durante nuestro paso por Posgrado, por los lugares y conocimientos compartidos.

A la Dra. Norma Angelica Ochoa Álvarez por su gran apoyo y capacitación de técnicas de microbiología desde el Laboratorio de Diagnostico Microbiológico del CIBNOR, y a su esposo el Dr. Martin Ramírez Orozco por el apoyo y seguimiento en la enseñanza y en técnicas de extracción, purificación y cuantificación de ARN de bacterias patógenas en el Laboratorio de Inmunogenómica Marina del CIBNOR.

A mi Comité Tutorial, la Dra. Cristina Escobedo Fregoso por su acompañamiento y enseñanzas desde el Laboratorio de Bioinformática y Genómica del CIBNOR, y su orientación en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal, por la formación dada años atrás que hoy fueron necesarias para la culminación de este proyecto, también su gran acompañamiento y resiliencia ante las adversidades, el ímpetu de trabajo y su pasión por la genómica.

Al Dr. Eduardo Quiroz Guzmán, especialmente por ser un Director de tesis con excelente guía en el proceso de investigación de este proyecto general, sin su pasión por la microbiología y enseñanza de ello el proyecto no sería igual, agradezco su compañía en el proceso de elaboración de este proyecto desde inicio hasta la conclusión de tal, la disponibilidad y presencia por aclarar cualquier duda o situación son inspiración para los que hoy en día decidimos ser parte de la investigación y divulgación científica del país.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología para la Integración Agroacuícola y Multitrófica, gracias por su apoyo y enseñanza de técnicas con bacteriófagos y bacterias patógenas, en especial a la Mc. María Liñán, Mc. Anais Lucero y IBQ investigación, agradezco a cada una de ellas por ser parte de este trabajo a través de estos dos años, gracias por formar parte y dejar un cachito de su vida en la mía y haber creído en mí. Esther Ponce, al Dr. Bernardo Veyrand y al Dr. Carlos Lomelí. A los compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Genómica, en especial a la técnico Gabriela Mendoza por siempre apoyarme durante mi estadía.

Son incontables las personas que hicieron posible que llegara la culminación de esta investigación, agradezco a cada una de ellas por ser parte de este trabajo a través de estos dos años, gracias por formar parte y dejar un cachito de su vida en la mía y haber creído en mí.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Glosario	x
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	3
2.1 Genoma <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3
2.2 Cromosomas <i>V. parahaemolyticus</i>	3
2.3 Genes de virulencia.....	5
2.4 Interacción bacteria-fago.....	6
2.5 Mecanismos de respuesta bacteriana y mecanismos de evasión viral.....	8
3.JUSTIFICACIÓN	12
4.HIPÓTESIS	13
5.OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Cepa bacteriana	15
6.2 Vibriofago.....	15
6.3 Cinética de crecimiento <i>V. parahaemolyticus</i>	16
6.4 Pruebas bioquímicas.....	16
6.4.1 Tinción de Gram.....	16
6.4.2 Evaluación de motilidad.....	17
6.4.3 Evaluación de la producción de citrato permeasa.....	17
6.4.4 Actividad catalasa	17
6.4.5 Actividad oxidasa	17
6.4.6 Rojo de metilo.....	18
6.4.7 Fermentación de hidratos de carbón	18
6.5 Curva de un solo paso.....	19
6.6 Infección de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> con PvVp04 y extracción del ARN.....	19
6.6.1 Purificación y cuantificación del ARN	20
6.6.2 Obtención del transcriptoma de <i>V. parahaemolyticus</i> infectado con el fago Vp04	20
6.7 Análisis bioinformático de genoma y transcriptoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21
6.7.1 Procesamiento de lecturas de la secuenciación del genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y del vibriofago vB_Vp_PvVp4	21

6.7.2 Ensamble de las secuencias de los genomas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y del vibriofago vB_Vp_PvVp4.....	21
6.7.3 Alineamiento y anotación funcional	22
6.7.4 Análisis de expresión diferencial de <i>V. parahamolyticus</i> infectado con el vibriofago vB_Vp_PvVp4	22
7.RESULTADOS	23
7.1 Cinética microbiana de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	23
7.2 Pruebas bioquímicas.....	23
7.3 Curva de un solo paso de bacteria-fago	25
7.4 Extracción de ARN de la infección bacteria-fago.....	26
7.5 Análisis bioinformático	28
7.5.1 Pre-procesamiento y ensamblaje de genoma bacteriano.....	28
7.6 Genoma <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
7.6.1 Análisis funcional <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
7.6.2 Cromosoma I.....	38
7.6.3 Cromosoma II.....	38
7.6.4 Plásmido.....	40
7.6.5 Genoma bacteriófago vB_Vp_PvVp4.....	41
7.7 Análisis transcriptómico	42
7.7.1 Preprocesamiento.....	42
7.7.2 Diseño experimental y normalización de las secuencias de ARN procesadas	46
8.DISCUSION	54
9.CONCLUSIONES	59
10.LITERATURA CITADA	60

Lista de figuras

Figura 1. Cinética de crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en caldo soya triptocaseina (TSB) durante 48 h.	23
Figura 2. Curva de un solo paso del bacteriófago vB_Vp_PvVp4 con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> como huésped bacteriano.....	26
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de las muestras de ARN enviadas a secuenciación. De arriba hacia abajo: primer nivel, los carriles (1 a 5) con muestras de ARN de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; segundo nivel, los carriles (1 a 5) muestras de ARN de la infección del bacteriófago vB_Vp_PvVp4 en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> como huésped.	28
Figura 4. Lecturas del genoma completo de <i>V. parahaemolyticus</i> después de su limpieza.	29
Figura 5. Análisis de los subsistemas de genes, únicos en el genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN003.	31
Figura 6. Genes asociados en procesos de patogenicidad como, factores de virulencia (65 genes) resistencia a antibióticos (60 genes) presentes en el genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
Figura 7. Anotación GO de los procesos biológicos, determinando la presencia de funciones como la integración del ADN en un 4.17 % de todas las secuencias y el ciclo de Krebs en un 4.17 % de ellas en el genoma completo de CIBGEN003.	33
Figura 8. Anotación GO por componente celular, donde más del 47 % de las secuencias están involucrados en la síntesis de componentes integrales de la membrana y hasta un 14.29 % de ellas participan en la síntesis del citoplasma en el genoma completo de CIBGEN003.	34
Figura 9. Anotación GO de la función molecular de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN 003, donde la abundancia de las funciones moleculares se encuentra en la unión de iones de magnesio con un 6.07 % de las secuencias del genoma completo de CIBGEN003.	35
Figura 10. Homología del genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN 003.Go.....	36
Figura 11. Cromosoma I de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN003.	38
Figura 12. Cromosoma II de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN003.	39
Figura 13. Regiones codificantes del plásmido bacteriano perteneciente a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CIBGEN003.	40
Figura 14. Visualización del genoma del fago vB_Vp_PvVp4.	41
Figura 15. log fold change con un valor de <i>P</i> ajustado del 0.05 del total de las matrices de expresión diferencial generadas a partir de los transcritos obtenidos y ensamblados al genoma completo.	47
Figura 16. Distribución de transcritos por clase o función establecida.....	48
Figura 17. Volcano plot de los 5038 genes presentes en el genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , donde destacan aquellos de la zona central (color azul) con un <i>p</i> value de 0.05.	49

Lista de tablas

Tabla 1. Comparativa de longitud cromosómica en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio Cholerae</i> ...	4
Tabla 2. Complejos proteicos del sistema de secreción tipo III en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> tomada de Ghenem et al. (2017).....	6
Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> como cepas control.	24
Tabla 4. Concentraciones de ARN total en las muestras obtenidas durante la extracción y subsecuente a la purificación y precipitación.....	27
Tabla 5. Anotación del genoma de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
Tabla 6. Organización de las regiones cromosómicas genoma completo de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> de acuerdo con la anotación genómica vía PROKA y BLAST	30
Tabla 7. Anotación EggNOG- Mapper del genoma de <i>V. parahaemolyticus</i> CIBGEN003, donde las secuencias proteicas son caracterizadas por su distribución.	37
Tabla 8. Reporte obtenido en fastp de la primera librería de ARN de la primera condición VB3.	42
Tabla 9. Reporte obtenido en fastp de la segunda librería de la primera condición (VB4) células bacterianas sin infectar con bacteriófago.....	44
Tabla 10. Reporte de calidad de las secuencias y preprocesamiento de las librerías de RNA-seq.	45
Tabla 11. Diseño experimental de las librerías de ARN obtenidas	46
Tabla 12. Lista de proteínas expresadas en CIBGEN 003 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	51
Tabla 13. Lista de proteínas silenciadas en CIBGEN 003 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52

Glosario

Bacteriófagos: Son virus que infectan exclusivamente a las bacterias.

Biosíntesis: Síntesis de compuestos orgánicos realizada por seres vivos o in vitro mediante enzimas.

Fenotipo: Rasgos observables en un organismo.

Fold change: Medida que describe cuánto cambia una cantidad entre una medición original y una posterior.

Genoma: Conjunto completo de ADN (material genético) en un organismo.

In silico: Método teórico de investigación, en el que se utilizan especialmente modelos informatizados.

Lisogenos: Se aplica a la bacteria que tiene un prófago hospedado en su material hereditario que puede desencadenar su lisis.

Líticos: Fagos que solo pueden multiplicarse en bacterias y matan a la célula debido a la lisis al término del ciclo de vida.

Patogenicidad: La capacidad de los parásitos para infectar un huésped y causar enfermedad.

Pro-fagos: Genoma de un fago que se ha perpetuado en la bacteria hospedadora al integrarse en su cromosoma.

Recombinación: Proceso por el cual una hebra de material genético se corta y luego se une a una molécula de material genético diferente.

Regulación transcripcional: Sistema proteico que controla la tasa de transcripción de genes.

Transposones: Representan segmentos de ADN que tienen la capacidad única de moverse y reinsertarse en nuevos lugares dentro del genoma.

1. INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria heterótrofa, Gram negativa, halófila, móvil por medio de un flagelo polar y flagelos peritricos. Sus condiciones óptimas de crecimiento se encuentran entre los 20° y 30° C de temperatura, pH de 7.0 a 8.6 (Gómez-Gil et al., 2013); habita en ambientes marinos y costeros alrededor del mundo; puede vivir de forma plantónica en la columna de agua, asociada a detritus o plancton, formando biofilms o como parte del microbiota intestinal de organismos marinos (Goulden et al., 2012). Posee la capacidad de formar biopelículas sobre casi cualquier superficie biótica y abiótica (Yildiz y Buick, 2009). Su distribución y dinámica en el agua están influenciadas por gradientes medioambientales como la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos; que debido a su metabolismo versátil y rápido crecimiento es capaz de adaptarse a los constantes cambios que las rodea (Leyton y Riquelme, 2008).

Posee dos cromosomas, en el cromosoma I (promedio de 3 Mpb) contiene los genes esenciales para el crecimiento bacteriano, mientras que el cromosoma II (promedio 1 Mpb) están aquellos genes que le permiten a la bacteria adaptarse a los cambios ambientales (Thompson *et al.*, 2004). Además, el genoma contiene elementos extra cromosomales móviles como pro-fagos, transposones y plásmidos, los cuales le permiten a la bacteria intercambiar su material genético con otras bacterias. De esta forma, adquieren genes que confieren una mayor adaptación a condiciones ambientales, genes de resistencia a antibióticos e incluso genes que codifican para factores de virulencia. Por consiguiente, *V. parahaemolyticus* forma parte de las especies de mayor importancia acuática por su gran plasticidad genómica (Urbanczyk *et al.*, 2013; Han, *et al.*, 2015a; Xiao *et al.*, 2017).

En general, la virulencia de *V. parahaemolyticus* varía considerablemente y aún no está definida la causa de su epidemiología (Lovell, 2017). Puede actuar como patógeno oportunista en organismos de importancia comercial como crustáceos (Yingkaajorn *et al.*, 2014), moluscos (Jones *et al.*, 2014), peces (Hatai *et al.*, 1981) e incluso afectar al ser humano. (Jones *et al.*, 2012). Por

ello, debido a las infecciones y a su vez la resistencia bacteriana que se ha encontrado hacia los antibióticos en algunas cepas de *V. parahaemolyticus* se ha considerado desarrollar nuevas alternativas para el control biológico (Dy *et al.*, 2018). Como es el uso de bacteriófagos como terapia alternativa para el control bacteriano en acuicultura (Liu *et al.*, 2022). Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente bacterias, introduciendo su material genético dentro de diferentes células bacterianas susceptibles y utilizan la mecánica metabólica del huésped para producir más bacteriófagos (Abedon, 2008). Los estudios sobre el mecanismo de los bacteriófagos líticos es esencial para el desarrollo de la fago terapia, donde la infección conduce exclusivamente a la muerte celular, lisis y liberación de partículas de la progenie del bacteriófago (Kropinski 2006; Cisek *et al.*, 2016). Por otra parte, las infecciones latentes por bacteriófagos lisógenos, generalmente implican la inserción del genoma de un fago en el cromosoma de su huésped, como profago, o en su lugar la existencia como plásmido. (J. J. Dennehy S., T. Abedon, 2012). Tal coevolución puede tener profundas consecuencias en todos los niveles de la organización biológica. Dada la abundancia de fagos y potencial impacto de la selección de fagos en poblaciones bacterianas, se presenta un alto interés para llevar a cabo estudios y lograr entender los procesos co-evolucionarios subyacentes de las interacciones entre bacterias y fagos líticos. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el transcriptoma bacteriano durante la infección del vibriofago vB_Vp_PvVp04 (PvVp04) a *V. parahaemolyticus* a fin de conocer las interacciones de ofensiva y defensa para determinar específicamente los genes involucrados en la etapa temprana de la infección bacteria-fago.

2. ANTECEDENTES

2.1 Genoma *Vibrio parahaemolyticus*

El genoma de *Vibrio parahaemolyticus* está reportado con un tamaño de 5.11848 MB, contenido en dos cromosomas, uno con 3,076 genes y otro menor de 1659 genes, codificando un aproximado total de 4572 proteínas y un porcentaje de GC del 45.3 % National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. *Vibrio parahaemolyticus*, número de acceso: [NC_004603](https://ncbi.nlm.nih.gov/nucl/NC_004603), NCBI, 2021).

Diversos estudios identificaron múltiples copias dispersas de ARNr en el genoma de *V. parahaemolyticus*, diez en el cromosoma I y uno en el cromosoma II (Tagomori, K., Iida, T. y Honda, T., 2002; Yasunaga, T., 2003; Chen, Y. *et al.*, 2011).

La mayoría de los genes esenciales requeridos para el crecimiento y la viabilidad están en el cromosoma I, mientras que el cromosoma II parece contener más genes relacionados con la regulación transcripcional y el transporte de varios sustratos, tiene genes esenciales del metabolismo que se ven involucrados en el crecimiento bacteriano. Además, todos los genes requeridos para la biosíntesis del flagelo polar están en el cromosoma I, mientras que los genes que codifican al flagelo lateral se encontraron en el cromosoma II, por lo que se sugiere que el cromosoma II contiene los genes para adaptación bacteriana (Pazhani, G. P., Chowdhury, G., y Ramamurthy, T. 2021).

2.2 Cromosomas *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus alberga un súper integron (SI) en el cromosoma I. El SI es de unos 48 kb de longitud y contiene aproximadamente 77 ORFs, que es mucho más pequeño en longitud que los SI en *V. cholerae* (120 kb) y en *V. vulnificus* (138 kb). La mayoría de los ORFs en las regiones del SI codifican proteínas hipotéticas, la diferencia de tamaño de este integron puede referir una mayor estabilidad en cuanto a la conservación de esa región que el resto del género *Vibrio* (Chen Y.,

2011). Si se compara el genoma de *V. parahaemolyticus* con el de *V. cholerae* (Tabla 1) la diferencia de tamaño podría haber surgido a través de la adquisición de genes por transferencia horizontal, debido a la existencia de elementos génicos móviles como transposones, fagos, regiones de ADN con un contenido G+C diferente del promedio de todo el genoma e islas génicas (que sirven como indicativo a dicha transferencia horizontal) en el cromosoma II de *V. parahaemolyticus* (Makino, K., et al., 2003).

Tabla 1. Comparativa de longitud cromosómica en *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio Cholerae*

	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
Tamaño total	5.11 MB	4.02 MB
Contenido GC	45.3 %	47.5 %
Cromosoma I	3.2 MB	2.9 MB
Cromosoma II	1.8 MB	1.1 MB

Nucleotide [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. *Vibrio parahaemolyticus*, número de acceso: [NC 004603](#), y *Vibrio cholerae*, número de acceso: [NZ_CP043554](#), NCBI, 2023).

Esto también sugiere que la transferencia horizontal de genes no es el factor principal involucrado en la diferencia de tamaño entre *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*, sino a factores de presión selectiva dado que *V. cholerae* está limitado a depender de un huésped humano con diferencia a otros *vibrios* (Wachsmuth, K., Blake, P. A., y Olsvik, Ø., 1994).

2.3 Genes de virulencia

Es sabido que el principal factor de virulencia de *V. parahaemolyticus* es la enterotoxina hemolisina termoestable directa (TDH) y en aquellas cepas que no se incluye se encuentra la hemolisina relacionada (THR) con la toxina termo hemolisina (TLH) ; conjunto a ellas se encuentra el sistema de secreción tipo III, ubicado en la isla de patogenicidad incluyendo en TDH, estas representan potencialmente dos tipos de mecanismos de virulencia en *V. parahaemolyticus*.

En el caso de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) enfermedad emergente causada por cepas específicas de *V. parahaemolyticus*, han demostrado que contiene un plásmido conjugativo de aproximadamente 70 kpb (pVA1) que posee los genes *pirA* y *pirB* que codifican para la toxina PirAB, causante de las lesiones características que presenta el hepatopáncreas del camarón (Tran *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015).

Además de las toxinas binarias PirA/ PirB, Los sistemas de secreción Tipo III y VI (T3SSs y T6Ss), las islas de patogenicidad de *Vibrio* también se encontraron comúnmente en *V. parahaemolyticus*, todos los cuales contribuyeron a la diversidad genómica de su género; esta última tiene dos complejos de sistema de secreción tipo III, (Tabla 2) que se encuentran en el cromosoma I (T3SS1) y el cromosoma II (T3SS2) (Calder *et al.*, 2014). T3SS1 contribuye principalmente a la citotoxicidad, mientras que T3SS2 contribuye principalmente a la enterotoxicidad y está regulado por una señalización en cascada, que compone la interacción de las proteínas EsxA, ExsC, ExsD y ExsE;

Tabla 2. Complejos proteicos del sistema de secreción tipo III en *Vibrio parahaemolyticus* tomada de Ghenem et al. (2017)

Sistema de secreción tipo III		
Ubicación	Complejo T3SS1	Complejo T3SS2
	ExsA Regulador transcripcional	VtrA Regulador transcripcional
Gen regulador y proteínas que codifica	ExsC Librera EsxA para activar el T3SS1	VtrB Regulador transcripcional
	EsxD Anti - activador transcripcional	ToxB Toxina proteica selectiva de huésped
Efectores	VopQ, VopS, VopR	VopA, VopC, VopZ, VopT, VopL y VopV

2.4 Interacción bacteria-fago

Las interacciones bacteria-fago son fundamentales para la ecología y la evolución de las comunidades bacterianas (Pal *et al.*, 2007). Se sabe que los fagos alteran la competencia entre cepas/especies bacterianas (Bohannon y Lenski, 2000a, b; Joo *et al.*, 2006; Koskella *et al.*, 2012), mantienen la diversidad bacteriana (p. ej., Buckling y Rainey, 2002a, b; Rodríguez -Valera *et al.*, 2009), y median la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Kidambi *et al.*, 1994; Canchaya *et al.*, 2003), desarrollando una diversidad de ciclos de vida y estrategias para lisar las células huésped procariontas para su propia reproducción; los fagos con un estilo de vida temperado y los fagos filamentosos son capaces de formar asociaciones a largo plazo con células bacterianas a través de la lisogenia, mientras que los fagos con un estilo de vida exclusivamente lítico son asesinos obligados que requieren lisis para transmitirse a la siguiente célula huésped (revisado en Clokie *et al.*, 2011; Abedon, 2012).

Sin embargo, las bacterias pueden desarrollar fácilmente resistencia al ataque de los fagos por mutación de *novo* y tienen diversos mecanismos para defenderse contra las infecciones por fagos (Bernheim, A., y Sorek, R., 2020). Dada la abundancia de fagos y el impacto potencial de la selección mediada por fagos en las poblaciones bacterianas, existe un creciente interés entre los ecologistas microbianos por comprender los procesos coevolutivos que subyacen a las interacciones entre las bacterias y los fagos líticos, donde las interacciones huésped-fago involucran diferentes pasos del proceso de infección (Koskella *et al.*, 2014; Breitbart *et al.*, 2018; Chevallereau *et al.*, 2021). La infección requiere que los fagos puedan adsorberse por medio de receptores específicos en la superficie de la célula bacteriana y luego eludir las defensas intracelulares del huésped (Hampton *et al.*, 2020). Trabajos recientes sobre *Vibrionaceae* marinas destacaron que la mayoría de los genes de defensa en contra de los fagos están codificados en elementos genéticos móviles que se ganan y pierden a altas tasas (Hussain *et al.*, 2021).

Por lo tanto, la coevolución con bacteriófagos tiene muchas consecuencias fenotípicas importantes para las bacterias, incluidos los costos de la resistencia (Bohannan y Lenski 2000), los efectos sobre la diversidad y la competencia de nichos en entornos espacialmente estructurados (Buckling y Rainey 2002; Brockhurst *et al.* 2004), el comportamiento social de los huéspedes (Morgan *et al.* 2012) y evolución de las tasas de mutación (Pal *et al.* 2007). Sin embargo, se sabe poco sobre las consecuencias genómicas de la coevolución bacteriana con fagos, y aunque ha habido una serie de estudios que utilizan la secuenciación del genoma completo (WGS) de bacterias y sus fagos (Kashiwagi y Yomo 2011; Marston *et al.* 2012; Le *et al.* 2014), interpretar los cambios genómicos subyacentes inmediatos es problemático ya que las poblaciones también se están adaptando al ambiente abiótico. Por lo tanto, una comprensión de las consecuencias genómicas de la coevolución requiere una comparación sistemática de las poblaciones bacterianas evolucionadas y coevolucionadas. Este enfoque experimental ha tenido éxito en el estudio de los efectos de la coevolución en las poblaciones de virus se ha revelado que la

coevolución acelera la evolución molecular en rasgos vinculados a la infectividad (Paterson et al. 2010; Kashiwagi y Yomo 2011).

No obstante, los estudios teóricos y empíricos previos nos permiten tener un panorama sobre los posibles efectos genómicos de la coevolución con el fago. Se estima que, existe una divergencia genómica y se debe a que la coevolución crea una presión de selección generando variación genética, es decir, tasas elevadas de mutación y recombinación debido a estas infecciones (Hamilton et al. 1990; Pal et al. 2007). También, dicha coevolución puede ralentizar la adquisición de algunas mutaciones beneficiosas para microorganismos patógenos como resultado de la competencia entre mutaciones (Felsenstein 1974; Gerrish y Lenski 1998); Frente a la abundancia y diversidad de fagos, las bacterias han desarrollado múltiples líneas de defensa, llamadas sistema inmune procariota (Kronheim, S., 2018). Los primeros estudios sobre la defensa bacteriana están centrados en actividades moleculares de Modificación-Restricción o sistemas de Infección Abortiva, además de los más recientes trabajos que refieren un enfoque amplio al sistema CRISPR-Cas (Bernheim, A., y Sorek, R., 2020). Las especies bacterianas pueden codificar individualmente diferentes sistemas de defensa, y estos sistemas pueden ser adquiridos por transferencia horizontal de genes, así como perderlos en una escala evolutiva corta (Van Houte, 2016).

2.5 Mecanismos de respuesta bacteriana y mecanismos de evasión viral

Li *et al.* (2022), estudiaron los genes de expresión diferencial o DEGs (por sus siglas en inglés *differentially expressed genes*) del hospedero *Vibrio alginolyticus* bajo la infección del fago HH109, los cuales se agruparon en genes: de biosíntesis de ácido nucleico, involucrados en la fase de infección temprana, transporte en la fase media y procesos metabólicos en etapas tardías de infección. Un ejemplo de genes en fagos líticos involucrados en la fase temprana de infección del fago incluye a los genes *nrdA* y *nrdB* que codifican la ribonucleósido difosfato reductasa en el fago T4, esta enzima es clave en la síntesis de ADN y cataliza el primer paso irreversible,

comprometiendo la síntesis de dNTPs de rNDPs, secuestrando así la síntesis de ácidos nucleicos del hospedero y redirigiéndola hacia la del fago.

Por otra parte, en un estudio reciente Hobbs *et al.* (2022), observaron que las bacterias pueden tener respuestas antivirales a través de la acumulación de Adenosín monofosfato cíclico (cAMP), esta respuesta de defensa da lugar a la lisis bacteriana, evitando la proliferación del fago. Estas moléculas presentan ser un factor limitante en el desarrollo de terapias que aprovechan los fagos para combatir infecciones bacterianas.

La presión selectiva de los fagos en las bacterias ha dado lugar a múltiples sistemas inmunológicos bacterianos, los cuales pretenden obstaculizar diferentes etapas del ciclo de vida de los bacteriófagos; dando como consecuencia el desarrollo de diferentes mecanismos de defensa por parte de los fagos a los mecanismos de inmunitarios de las bacterias huésped (Hampton, H. G., 2020). Una estrategia de exclusión a la superinfección es la que ocurre entre el fago T4 y *E. coli*, en donde las proteínas Imm y Sp previenen de la translocación en la membrana de otros fagos T-even, siendo estos conocidos por tener la capacidad de cesar todo el metabolismo de cepas de *E. coli* (Dy, R. L., 2014).

Otro sistema de resistencia a fagos es la mutación del receptor ompU en *Vibrio cholerae* confiriendo resistencia al vibriofago ICP2 (Seed, K. D., *et al.*, 2014); además las proteínas de unión a receptores (RBPs) de fagos que se unen a los receptores bacterianos tienen una alta tasa de mutación. Los receptores pueden determinar el rango de huéspedes con potencial biotecnológico o médico, mediante la caracterización de mecanismos de inmunidad, así como de evasión de fagos (Doron, S. *et al.*, 2018; Koonin, E. V *et al.*, 2017; Van Houte *et al.*, 2016).

En otro escenario algunas bacterias han llegado a producir diversos métodos para prevenir la adsorción de fagos, desde la producción de vesículas extracelulares (OMV por sus siglas en inglés

outer membrane vesicles) con el receptor de unión a fago en sus membranas como señuelos, siendo esto constitutivo en bacterias gram negativas (Manning, A. J., 2011). No obstante, los OMV tienen efectos complejos en la dinámica de los bacteriófagos ya que también pueden extender el rango de estos, mediante la transferencia del receptor de membrana por vesículas extracelulares a cepas como *Bacillus subtilis* que antes no contaban con él, haciéndolas ahora susceptibles e inclusive resistentes a los fagos (Tzipilevich, E., 2017).

Las interacciones entre bacterias y fagos pueden tener consecuencias importantes para las comunidades microbianas. Los cocultivos de bacterias y fagos, permiten evaluar los cambios en la resistencia y susceptibilidad a los fagos, y pueden proporcionar información sobre dinámicas coevolucionarias, como lo son el ejemplo de *E. coli* y fagos T-even, donde las bacterias se hicieron resistentes a través de una modificación en su superficie (Buckling, A., y Rainey, P. B., 2002); mientras que experimentos con *Pseudomonas fluorescens* SBW25 y el fago Φ 2 mostraron coevolución a lo largo del tiempo (Lenski, R. E., 1985).

Existen casos especiales donde algunos profagos son capaces de tener sistemas inmunitarios que previenen la infección posterior por otros fagos superinfectantes, los genes responsables de esto se encuentran en regiones genéticas del genoma accesorio, donde la mayoría de los genes pertenecen a los llamados 'morons' cuya función se desconoce y se han visto asociados a funciones que benefician al anfitrión, como los sistemas de defensas. Un ejemplo son los casetes de inmunidad dentro de *M. smegmatis* que proporciona defensa a fagos mediante la codificación de proteínas de restricción-modificación, RM (Restriction–modification), y componentes toxina-antitoxina, así como otros sistemas de defensa. Los sistemas de RM son de los sistemas más caracterizados, son muy diversos y ubicuos, y están presentes en alrededor del 90% de los genomas bacterianos. Estos sistemas distinguen el ADN propio del extraño y comienza a cortar el ADN viral después de su inyección (Oliveira, P. H., 2014).

Los mecanismos de resistencia a fagos y sus mecanismos de evasión son diversos, y a pesar de los considerables avances, el conocimiento es limitado en cuanto a la defensa bacteriana y la adaptación de los fagos a través de estudios en células individuales, comunidades, ecosistemas o a una escala global. Los mecanismos que demuestran una visión del arsenal de defensa y contra-defensa, requiere enfoques más sistemáticos.

3. JUSTIFICACIÓN

La relación entre los hospedadores bacterianos y los fagos que los infectan, es un factor importante de los procesos ecológicos y evolutivos en las comunidades microbianas, dicha interacción afecta la estructura de la comunidad y da forma a la evolución de rasgos bacterianos ecológica y biotecnológicamente relevantes; aunque la línea de estudio de la coevolución bacteria-fago es muy reciente, existen preguntas sobre la especificidad de la interacción, las redes de genes silenciados y expresados y la importancia de la interacción coevolutiva entre comunidades y entornos complejos; por lo que se dilucidó el proceso infectivo, y el impacto de la coevolución en el fenotipo bacteriano, particularmente de especies de impacto económico en la acuicultura, como *V. parahaemolyticus*, que presenta interacciones moleculares con diversos entes virales debido al nicho que cohabita, el estudio de tal respuesta representa una gran propuesta para las limitaciones y desarrollo de terapias que aprovechan los fagos para combatir infecciones bacterianas.

4. HIPÓTESIS

La infección de *Vibrio parahaemolyticus* con el vibriofago vB_Vp_PvVp04, dará como resultado cambios a nivel transcriptómico, lo cual permitirá identificar los cambios en la expresión génica como mecanismo de respuesta molecular bacteria-fago.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar los efectos ocasionados por el vibriofago vB_Vp_PvVp04 sobre la expresión génica de *Vibrio parahaemolyticus* durante el proceso de infección.

5.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la cinética microbiana y capacidad metabólica de *Vibrio parahaemolyticus*.
- 2) Determinar los tiempos de eclipse latencia, así como el tamaño de estallido del fago vB_Vp_PvVp04 en *Vibrio parahaemolyticus* como huésped.
- 3) Obtener el ensamble y la anotación del genoma completo de *Vibrio parahaemolyticus* y el fago vB_VpPvVp04
- 4) Identificar la respuesta transcripcional de *Vibrio parahaemolyticus* infectado por el fago vB_Vp_PvVp04 mediante el análisis de RNA-Seq.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cepa bacteriana

El presente trabajo se realizó con la cepa *Vibrio parahaemolyticus* (CIBGEN 003) perteneciente a la colección del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste aislada de hepatopáncreas de camarón aparentemente afectado por AHPND. Los experimentos se realizaron con *V. parahaemolyticus* ajustada con solución salina (2.5% de NaCl) a una densidad óptica de 1 a 600 nm ($DO_{600}=1.0$) cuantificada con espectrofotómetro a 35°C. El número de unidades formadoras de colonias (1.3×10^{-7} UFC ml⁻¹) se determinó mediante diluciones decimales en placas de agar soya tripticaseína (TSA) suplementado con 2.5% de cloruro de sodio.

6.2 Vibriofago

El vibriofago vB_Vp_PvVp04 (PvVp04) fue aislado de hepatopáncreas de camarones con signos de AHPND, de acuerdo con el procedimiento descrito por Kropinski *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. A partir de muestras de juveniles de camarón se realizaron de manera estéril extracciones del hepatopáncreas los cuales fueron colocados en tubos con de solución salina (2.5% NaCl) para ser homogenizados con un disruptor de tejidos e inoculado con 1 mL de suspensión cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* en solución salina ($OD_{600}=1$ que corresponde a 2.1×10^8 CFU mL⁻¹). Los homogeneizados se incubaron a 25°C durante 24 h y se filtraron alícuotas de 10 mL utilizando filtros de jeringa Acrodisc de 0.2 µm (PALL Corporation, NY, EE. UU.). Utilizando el método de prueba puntual, se colocaron 13 µl de homogeneizado sobre césped de *V. parahaemolyticus* en placas TSA y se incubaron durante 18 ha 35°C. Las zonas líticas positivas se re suspendieron en solución salina filtrada con filtro de jeringa de 0.45 µm. Se realizó el método de doble capa utilizando diluciones en serie para obtener placas de fago individuales (Kropinski *et al.*, 2009), y la placa correspondiente a PvVp04 se volvió a aislar tres veces para garantizar la pureza del fago.

6.3 Cinética de crecimiento *V. parahaemolyticus*

La tasa de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* se evaluó a partir de un cultivo de 24 h en caldo soya triptocaseina (TSB) suplementado con NaCl al 2.5% como pre inóculo, este se cultivó por triplicado en 50 mL de TSB, a densidad óptica de $OD_{600} = 0.3$ donde las primeras 2 h se evaluó su densidad óptica cada 10 minutos, posteriormente se evaluó cada 30 minutos hasta las 12 h, finalmente se evaluó cada hora hasta las 48 h que duró el análisis, para ser cultivadas en placa bajo una dilución seriada 1:10 y cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC) cada hora.

6.4 Pruebas bioquímicas

La caracterización bioquímica de *Vibrio parahaemolyticus* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Mac Faddin (2003) y Díaz *et al.* (1995) con modificaciones: movilidad, indol, ornitina, citrato de Simmons, catalasa, oxidasa, rojo de metilo, fermentación de hidratos de carbono, rango de temperatura (4, 15, 25, 30, 35 y 45°C), rango de cloruro de sodio (0, 3, 6, 8, 10 y 13%), utilizando las cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Staphylococcus aureus* como control positivo y negativo según fuera el caso de la prueba (Garrity, G. M., 2005).

6.4.1 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram (Gram, 1884) con un Kit comercial para evaluar el tipo de Gram que es *Vibrio parahaemolyticus*, adicionalmente se determinó su forma celular mediante la observación con microscopio.

6.4.2 Evaluación de motilidad

El medio semisólido Movilidad, Indol y Ornitina (MIO) se utilizó para diferenciar el grupo de enterobacterias mediante la motilidad, la actividad de ornitina descarboxilasa y la producción de indol. La motilidad evaluada en la cepa de CIBGEN 033 se determinó evaluando el trayecto de la picadura de inoculación, y la evaluación de Ornitina se determinó mediante un viraje del medio (Ederer y Clark, 1970).

6.4.3 Evaluación de la producción de citrato permeasa

Se determinó la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* para metabolizar el citrato como única fuente de carbono en ausencia de fermentación de azúcares o de producción de ácido láctico y el fosfato de amonio como única fuente de fosfato, utilizando agar citrato de Simmons. Se inoculó un cultivo microbiano de 24 h con asa recta en el medio Citrato de Simmons durante 24 h. El resultado es negativo cuando no se presenta cambio en la coloración, ni crecimiento (Koneman, 1997; Mac Faddin, 2003).

6.4.4 Actividad catalasa

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. La actividad catalasa se determinó añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre una asada del cultivo microbiano en un portaobjetos, donde se observó la formación inmediata de una efervescencia con desprendimiento de burbujas (Mac Faddin, 2003).

6.4.5 Actividad oxidasa

Esta prueba determina la presencia de enzimas oxidasas, porque el reactivo utilizado activa la oxidación del citocromo para reducirlo por oxígeno molecular y producir agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana. Además, la presencia de oxidasa va ligada a la producción

de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. Se utilizaron sensidiscos impregnados con parafenilandiamina, en donde se colocó una asada del cultivo microbiano utilizando un asa especial de platino. Si las células contienen citocromo c oxidasa, el reactivo se vuelve de color violeta o púrpura, si no es así, el disco se queda incoloro (Mac Faddin, 2003).

6.4.6 Rojo de metilo

Se evaluó la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* para producir y mantener estables los productos ácidos de la fermentación de la glucosa utilizando la prueba de rojo de metilo que cuantifica la producción de ácido que determina el pH. Se inoculó un cultivo microbiano de 24 h con un asa en caldo rojo de metilo a 35°C durante 48 h mínimo ya que, si la prueba se realiza en menos de 48 h, todos los microorganismos podrían dar un falso positivo, sin embargo, posterior a la incubación (2 a 5 días), los microorganismos rojos de metilo positivos son capaces de mantener la producción de ácidos que disminuye el pH terminal, manteniendo un ambiente ácido. Posteriormente a la incubación se agregaron 5 gotas del indicador de pH rojo de metilo. El resultado es positivo si el medio se mantiene rojo brillante (pH 4.4 - 4.2), amarillo negativo (pH 6.0), naranja indica una reacción tardía y es necesario repetir la prueba (Mac Faddin, 2003).

6.4.7 Fermentación de hidratos de carbón

Se evaluó la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* para fermentar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas. Se inoculó con asa un cultivo de 24 h en el caldo base adicionado con cada uno de los azúcares (glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, arabinosa, trehalosa, xilosa, galactosa y maltosa), y posteriormente se incubó a 35°C durante 24 h y se fue evaluando el viraje del medio TSI, así como la producción de gas en tubo Durham (Mac Faddin, 2003).

6.5 Curva de un solo paso

Para determinar el periodo de latencia y el tamaño del estallido del fago Vp04, se emplearon células bacterianas de *Vibrio parahaemolyticus* de 24 h de cultivo suspendidas en solución salina al 2.5%, las cuales se separaron por centrifugación y se re suspendieron en caldo TSB (NaCl suplementado con 2.5% NaCl). El fago se incorporó en un orden de multiplicidad de infección (MOI) de 1 (1 virus por célula bacteriana) por 90 min a 37°C. Posteriormente se centrifugaron a 5,000 g por 10 min, los pellets con las células infectadas se lavaron dos veces y se re suspendieron en TSB precalentado a 35°C. La mezcla se incubó a 35°C y se tomaron muestras por intervalos de 10 min (hasta llegar a 90 min) para determinar la titulación del fago mediante el método de agar de doble capa y obtener la curva de un paso. El periodo de latencia se determinó con el tiempo que tarda una partícula de fago en reproducirse y liberarse de una célula huésped infectada. El tamaño del estallido se calculó dividiendo el número de UFP en la saturación de fagos por el número de UFP inicial (Kropinski, 2018).

6.6 Infección de *Vibrio parahaemolyticus* con PvVp04 y extracción del ARN

La infección bacteria-fago se realizó por triplicado en tubos eppendorf con 800 µL de TSB suplementado con 2.5 % de NaCl con un cultivo de *Vibrio parahaemolyticus* en la fase exponencial cuando la bacteria tiene una absorbancia de $OD_{600} = 1.5$, equivalente a $9.97E+10$ cel/mL con 200 µL del fago PvVp04 durante 5 minutos, y como control se mantuvo *V. parahaemolyticus* sin infectar. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g a 4°C durante 10 min, y se recuperaron 100 µg de células. Se realizó la extracción de ARN utilizando Ribozol™ como reactivo de extracción y cloroformo, tomando el 80% de la fase acuosa para después precipitar con propanol por 24 h. Posteriormente se hicieron lavados con etanol frío al 75% y, por último, se decantó y se dejó secar 5 min. La calidad del ARN se evaluó en Nanodrop a 260/280 nm, y la integridad se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando un buffer TAE 1X.

6.6.1 Purificación y cuantificación del ARN

Cada muestra infectada y no infectada se trató con DNasa de Promega™, llevando a cabo la digestión con ARN en agua libre de nucleasas, durante 30 min a 37°C, se añadió 1 µL de stop solution y se incubó durante 10 min a 65°C para detener la reacción enzimática. Las muestras se almacenaron a -20°C. Se precipitó el ARN con cloruro de litio (LiCl) 8 M y etanol al 100% (1/10) durante 24 h a -20°C. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 g por 15 min a 4°C y se realizó un lavado con etanol al 75%, repitiendo este proceso una vez más. Se decantó la muestra y se secó la muestra a temperatura ambiente por 10 min, para finalmente re suspender el ARN purificado en 50 µL de agua libre de nucleasas. La cuantificación del ARN se realizó con el Kit ARN broad range de Qubit™, incubando 2 µL de ARN, working solution: reagent (1 µl) y buffer (199 µL) durante 2 min a temperatura ambiente, y se analizó en el equipo Qubit.

6.6.2 Obtención del transcriptoma de *V. parahaemolyticus* infectado con el fago Vp04

Una vez obtenido el ARN puro y cuantificado, se enviaron las muestras para su secuenciación a la empresa Novogen© donde el ARN ribosomal fue removido del ARN total, seguido por la precipitación del etanol. Después de la fragmentación, la síntesis de ADNc fue realizada con *random primers* y durante la síntesis de la segunda cadena fueron sustituidos los dTTPs por dUTPs en el buffer de reacción, después se reparan los extremos de ambas cadenas de la adición de A y adaptadores, para finalizar removiendo la contaminación por el UTP contenido en la segunda cadena empleando enzimas de digestión para finalizar con una amplificación y purificación, para proseguir con la preparación de librerías, donde cada muestra fue sometida a controles de calidad, antes y después de la construcción de estas; únicamente las muestras que pasan los filtros de calidad fueron procesadas. La secuenciación se realizó con la plataforma de Illumina

NovaSeq 6000, obteniendo lecturas pareadas (Fw y Rv), con un tamaño de secuencias de 150 pb. Se obtuvieron los archivos FASTQ los cuales fueron analizados en Fastp (Trivedi *et al.*, 2014) para evaluar la calidad de las lecturas (Q).

6.7 Análisis bioinformático de genoma y transcriptoma de *Vibrio parahaemolyticus*

6.7.1 Procesamiento de lecturas de la secuenciación del genoma de *Vibrio parahaemolyticus* y del vibriofago vB_Vp_PvVp4

La cepa de CIBGEN003 fue incubada por 24 horas para la extracción de ADN utilizando Ribozol™ como reactivo de extracción y cloroformo, la secuenciación se realizó en el laboratorio de Genómica y bioinformática del CIBNOR, con la plataforma de Illumina MiSeq System v2, con lecturas pareadas (Fw y Rv), dichas lecturas con tamaño de 150 pb por los dos sentidos. Se obtuvieron las secuencias en archivos FASTQ, las cuales fueron analizadas y filtradas con el programa Fastp v0.23.1 (Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., y Gu, J. (2018) para evaluar la calidad de las lecturas con base a la calidad de Phred ($Q \geq 30$), valor que indica que el error sería de 1 base entre 1000, con un 99.9% de precisión, también se eliminaron los adaptadores empleados en la secuenciación, y se obtuvo un reporte QC de cada una de las lecturas antes y después de su limpieza y filtración.

6.7.2 Ensamble de las secuencias de los genomas de *Vibrio parahaemolyticus* y del vibriofago vB_Vp_PvVp4

Los archivos con lecturas limpias (R1 Y R2) fueron ensamblados con el algoritmo de Unicycler v0.4.8, y se evaluaron las métricas de los contigs. Se utilizó el programa QUAST v5.0.2 para la evaluación del ensamble de los genomas total, determinando así el número de contigs ≥ 0 bp y ≥ 1000 bp., N50, N75, L50, L75 y el porcentaje GC; además de la realización del bandage plot del ensamble por medio de Bandage Version: 0.8.1.

6.7.3 Alineamiento y anotación funcional

Se realizó el alineamiento de los contigs obtenidos utilizando de referencia el genoma de *Vibrio parahaemolyticus* O3 con acceso en GenBank: [AAXOPW000000000.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AAXOPW000000000.2). Se determinó la homología con el 99% de identidad, cobertura del 98.2%, y un E-value cercano a cero. La información genómica alineada se ordenó por cromosomas para su posterior anotación de genes, la cual se realizó con las bases de datos PATRIC, GeneBank, BV-BRC, Victors, DrugBank, CARD, TCDB, RASTtk y PROKKA. El enriquecimiento funcional se realizó con el programa Blast2Go. Además, se realizó un alineamiento *in silico* global, contra las especies ortólogas *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. diabolicus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, y *V. parahaemolyticus* K33 mediante la herramienta Mauve v2.4.0.

6.7.4 Análisis de expresión diferencial de *V. parahamolyticus* infectado con el vibriofago vB_Vp_PvVp4

El pre-procesamiento de las secuencias se realizó con el programa Fastp v v0.23., eliminando adaptadores y secuencias de baja calidad. Se realizó el alineamiento de estas secuencias al genoma de referencia ya ensamblado, utilizando la herramienta HiSAT2 v2.2.1, después los transcritos fueron ensamblados con StringTie v2.2.0 empleando la función *merge transcript* para contar con un conjunto uniforme de transcritos para todas las muestras. Con los archivos GFF se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial utilizando gffcompare v0.12.6; StringTie- eB y Ballgown, considerando un *P-value* de 0.5 y *Fold change* de 1 hasta 5.

7. RESULTADOS

7.1 Cinética microbiana de *Vibrio parahaemolyticus*

Durante la cinética microbiana se observó que el crecimiento exponencial de *Vibrio parahaemolyticus* fue a partir de las 5 h, alcanzando una población de 5.64×10^7 cel/mL (Fig. 1), La máxima cantidad de células (1.2×10^{09} cel/mL) se obtuvo a las 30 h, seguido de una fase estacionaria a partir de las 35 h.

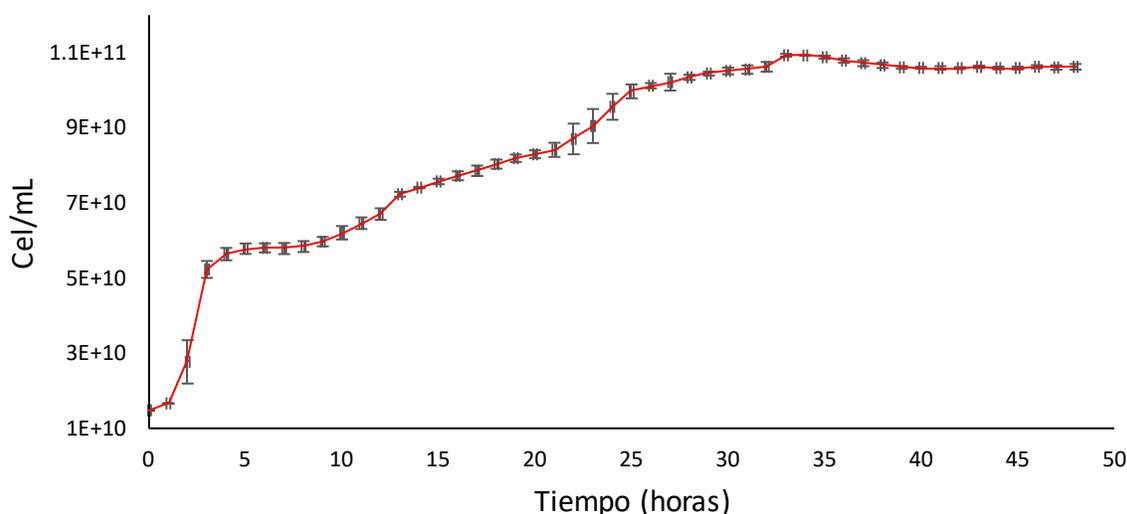


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en caldo soya triptocaseína (TSB) durante 48 h.

7.2 Pruebas bioquímicas

De acuerdo con las pruebas bioquímicas se observó la capacidad metabólica de *V. parahaemolyticus* para fermentar carbohidratos desde glucosa, manitol, sorbitol hasta maltosa, xilosa, arabinosa y galactosa siendo la única excepción la lactosa. Tolera concentraciones de salinidad de 3%, 5% y 8%, y temperatura de 15° a 45°C. Sin embargo, se obtuvieron resultados negativos en el caso de las pruebas de: citrato de simmons para la diferenciación de enterobacterias, oxidasa para la determinación de presencia de enzimas oxidadas, rojo de metilo que permite determinar la capacidad de fermentar la glucosa con producción de ácido, y catalasa

donde la liberación de oxígeno en la prueba indica que la bacteria posee enzimas catalasas, siendo esta última prueba la única a la cual la cepa CIBGEN003 fue positiva (Tabla 3).

Tabla 3. Pruebas bioquímicas realizadas a *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella aerogenes* y *Staphylococcus aureus* como cepas control.

Prueba	Cepa		Controles	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Movilidad	-	+	+	-
Indol	-			-
Ornitina	-	+	+	-
Citrato de Simmons	-	-	+	-
Catalasa	+	NA ¹	NA ¹	+
Oxidasa	-	-	NA ¹	NA ¹
Rojo de metilo	-	+	-	NA ¹

FERMENTACIÓN HIDRÁTOS DE CARBONO:

Glucosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Lactosa	-	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Manitol	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Sorbitol	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Arabinosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Trehalosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Xilosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Galactosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Maltosa	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹

RANGO DE TEMPERATURA:

4°C	-	NA ¹	NA ¹	NA ¹
15°C	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
25°C	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
30°C	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
35°C	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
45°C	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹

RANGO DE NaCl:

0%	-	NA ¹	NA ¹	NA ¹
3%	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
6%	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
8%	+	NA ¹	NA ¹	NA ¹
10%	-	NA ¹	NA ¹	NA ¹
13%	-	NA ¹	NA ¹	NA ¹

Notas: ¹ No Aplica.

7.3 Curva de un solo paso de bacteria-fago

Los resultados de la curva de un solo paso mostraron que el vibriofago vB_Vp_PvVp4 tiene un periodo de latencia aproximado de 50 min en *Vibrio parahaemolyticus* como huésped, mientras que el tamaño del estallido se estimó en 12.46 UFP cel⁻¹. En el minuto 15 se observa el tiempo final de la etapa de eclipse (Fig. 2), es en este período de tiempo donde ocurren todos los procesos asociados al proceso infeccioso, estando en los últimos minutos ocurriendo la acumulación de viriones y la liberación de estos, ocurre en la etapa final del período de eclipse.

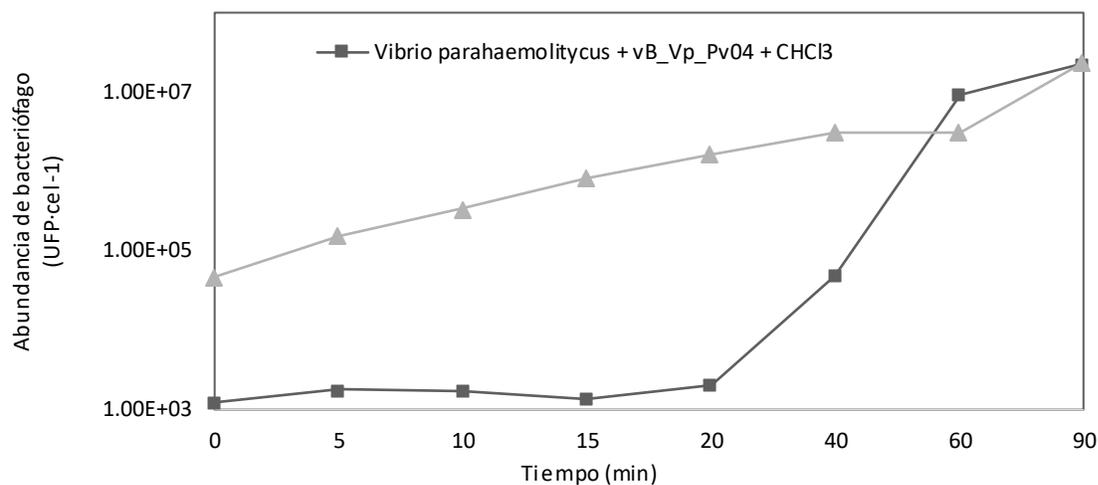


Figura 2. Curva de un solo paso del bacteriófago vB_Vp_PvVp4 con *Vibrio parahaemolyticus* como huésped bacteriano.

7.4 Extracción de ARN de la infección bacteria-fago

Se obtuvo el ARN total de cada muestra estudiada, la concentración después de la purificación con DNasa y la precipitación con LiCl fue cuantificada por medio de un equipo NanoDrop™ (Tabla 4) y después se corroboró con Qubit™ Broad Range (Tabla 5) una vez obtenido el valor real de la concentración del ARN total. Posteriormente se pasó a la etapa de secuenciación. Los carriles 5 y 2, marcan aquellas muestras que pasaron los niveles de pureza con NanoDrop™ y fueron seleccionadas para su cuantificación por Qubit™ y posterior secuenciación.

Tabla 4. Concentraciones de ARN total en las muestras obtenidas durante la extracción y subsecuente a la purificación y precipitación.Notas: ¹ Vp9, Muestra de células bacterianas de *Vibrio parahaemolyticus*; ² VpF11, Muestra de células bacterianas de *Vibrio parahaemolyticus* infectadas con el vibriofago Vp04;

Tubo	Muestra	Volumen inicial	Extracción				Después de la purificación y precipitación				
			ng/μL	260/280	260/230	ng totales	Vol. Final ³	ng/μl	260/280	260/230	ng totales
1	Vp9 ¹	45 μL	441.3	1.83	2.44	19,858.50	49 μL	251.3	1.88	1.82	12,313.70
2	VpF11 ²	45 μL	442.6	1.86	2.27	19,917.00	49 μL	242.6	1.98	2.05	11,887.40

³ Volumen final de la purificación y precipitación fue resuspendido en 50 μL de agua libre de nucleasas.



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de las muestras de ARN enviadas a secuenciación. De arriba hacia abajo: primer nivel, los carriles (1 a 5) con muestras de ARN de *Vibrio parahaemolyticus*; segundo nivel, los carriles (1 a 5) muestras de ARN de la infección del bacteriófago vB_Vp_PvVp4 en *Vibrio parahaemolyticus* como huésped.

7.5 Análisis bioinformático

7.5.1 Pre-procesamiento y ensamble de genoma bacteriano

El porcentaje de las lecturas antes de la limpieza fue de 3.124230 M, las cuales disminuyeron de cantidad, al ser filtradas a ser 1.1730098 M, con un Q=20 de 99.32% y un Q=30 de 99.05%. El contenido GC corregido fue de 45.61 a 45.50 % (Fig. 4). El ensamble del genoma bacteriano se conformó de 163 contigs con una longitud de 5.2 Mb.

After filtering: merged: base contents

Value of each position will be shown on mouse over.

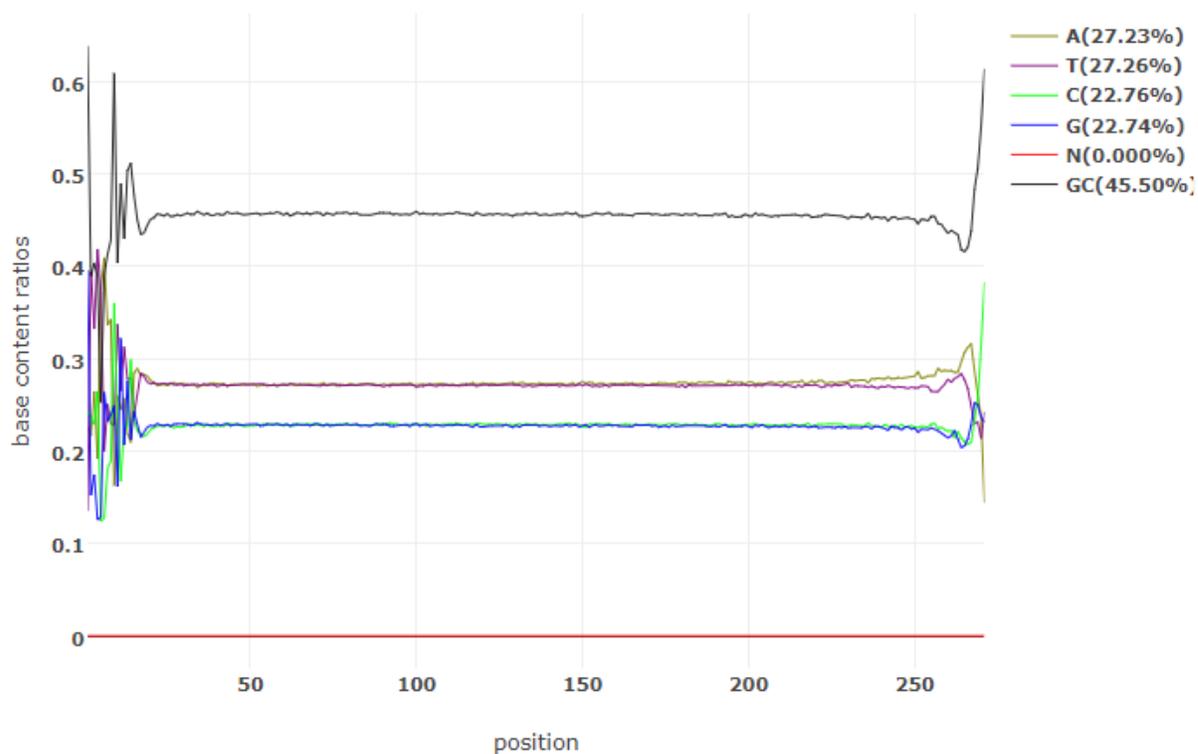


Figura 4. Lecturas del genoma completo de *V. parahaemolyticus* después de su limpieza.

7.6 Genoma *Vibrio parahaemolyticus*.

Tabla 5. Anotación del genoma de *Vibrio parahaemolyticus*.

Región génica	Cantidad en el genoma
CDS	5033
tRNA	82
rRNA	4
Proteínas hipotéticas	1210
Proteínas funcionales	3823

Se obtuvieron 96 contigs para el cromosoma I, 21 contigs para el cromosoma II y 44 contigs para el plásmido (Tabla 6). Con la herramienta PROKSEE se visualizaron las regiones del genoma, obteniendo elementos génicos, como tRNA's (tRNA-Met-CAT, tRNA-Leu-TAG, tRNA-Thr-TGT, entre otros), rRNA's (ambas subunidades del 16S y dos codificantes del ARN 5S).

Se obtuvieron 5033 regiones codificantes cuyas funciones están involucradas en procesos metabólicos y celulares representando un 99.7 % del genoma completo.

Tabla 6. Organización de las regiones cromosómicas genoma completo de *Vibrio parahaemolyticus* de acuerdo con la anotación genómica vía PROKA y BLAST

Cromosoma I	96 contigs
	3081 CDS
	4104 ORF's
	73 tRNA
	4 rRNA
Cromosoma II	21 contigs
	1653 CDS
	2296 ORF's
	9 tRNA
Plásmido	44 contigs
	114 CDS
	135 ORF's

A partir de la base de datos de PATRIC, se identificaron redes metabólicas que llevan a cabo procesos importantes en la célula bacteriana, tales como los involucrados en el metabolismo con 804 genes involucrados en ello, transporte de proteínas, y procesamiento de ADN y RNA, respuesta a estrés y señalización de la regulación celular (Fig. 5).

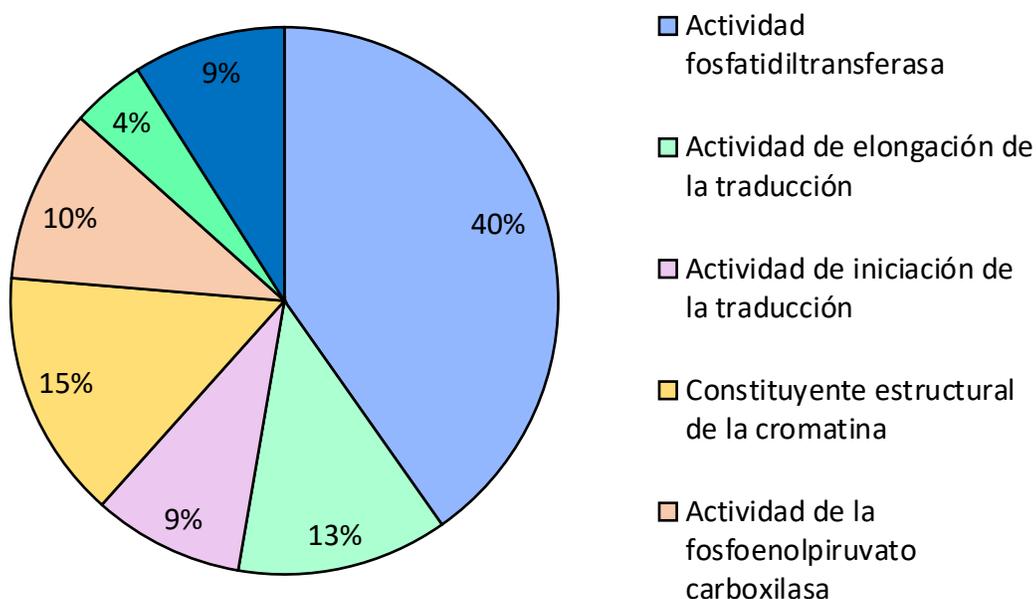


Figura 5. Análisis de los subsistemas de genes, únicos en el genoma de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003.

De los genes del genoma, se determinó la presencia de genes especiales, vía PATRIC, con aportaciones de CARD, DrugBank, Victors, TTD. Se obtuvieron 65 genes de virulencia presentes en todo el genoma (Fig. 6).

Se identificaron los genes beta-lactamasa, siendo estas lactamasas de clase A que pueden hidrolizar carbenicilina uno de los subgrupos de las penicilinas y AMP cíclico permitiendo inhibir colonias bacterianas adyacentes, ambos involucrados altamente en la resistencia a antibióticos.

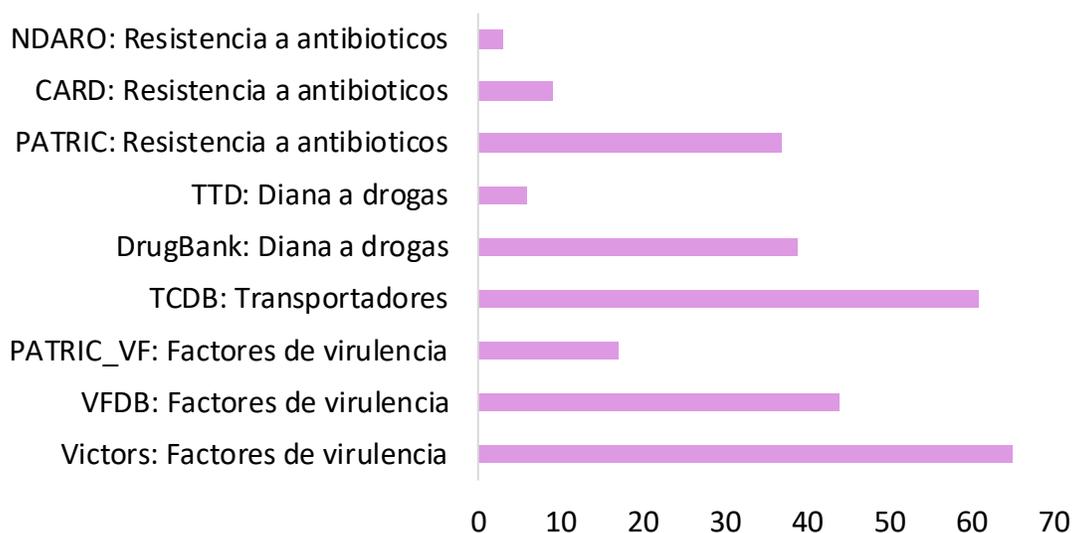


Figura 6. Genes asociados en procesos de patogenicidad como, factores de virulencia (65 genes) resistencia a antibióticos (60 genes) presentes en el genoma de *Vibrio parahaemolyticus*.

7.6.1 Análisis funcional *Vibrio parahaemolyticus*

El porcentaje de identidad del genoma fue del 91% con *Vibrio parahaemolyticus* (Fig. 11). Y con relación a otras especies fue de 2.27% con *Vibrio vulnificus*, 1.52% con *Vibrio alginolyticus*, 1.52% con *Vibrio owensii*, 0.76% con *Vibrio anguillarum*, *Agarivorans sp. B2Z047*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio scophthalmi*, *Vibrio aphrogenes* y *Vibrio gazogenes*.

Las funciones biológicas asociadas a las secuencias de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003 (Fig. 8) fueron: iniciación de la replicación de ADN (8.33 %), cambios topológicos en el ADN (8.33%), regulación de la transcripción del ADN (8.33 %), procesamiento de señales peptídicas (4.17%), transporte transmembranal (4.17%), respuesta a antibióticos (4.16 %) entre otras funciones; y aquellas secuencias cuyas funciones moleculares que se encuentran altamente relacionadas en

la unión de iones (Figura 9). También fue posible mapear las secuencias proteicas por EggNOG- Mapper para así conocer su función, así como la categoría COG; de las 5033 regiones codificantes el 16.29 % se encuentran involucradas en el procesamiento y almacenamiento de información, transcripción, traducción, replicación y recombinación; un 19.81 % de estas regiones tiene participación en el procesamiento de señales celulares y un 28.68 % de estas codifican productos del metabolismo.

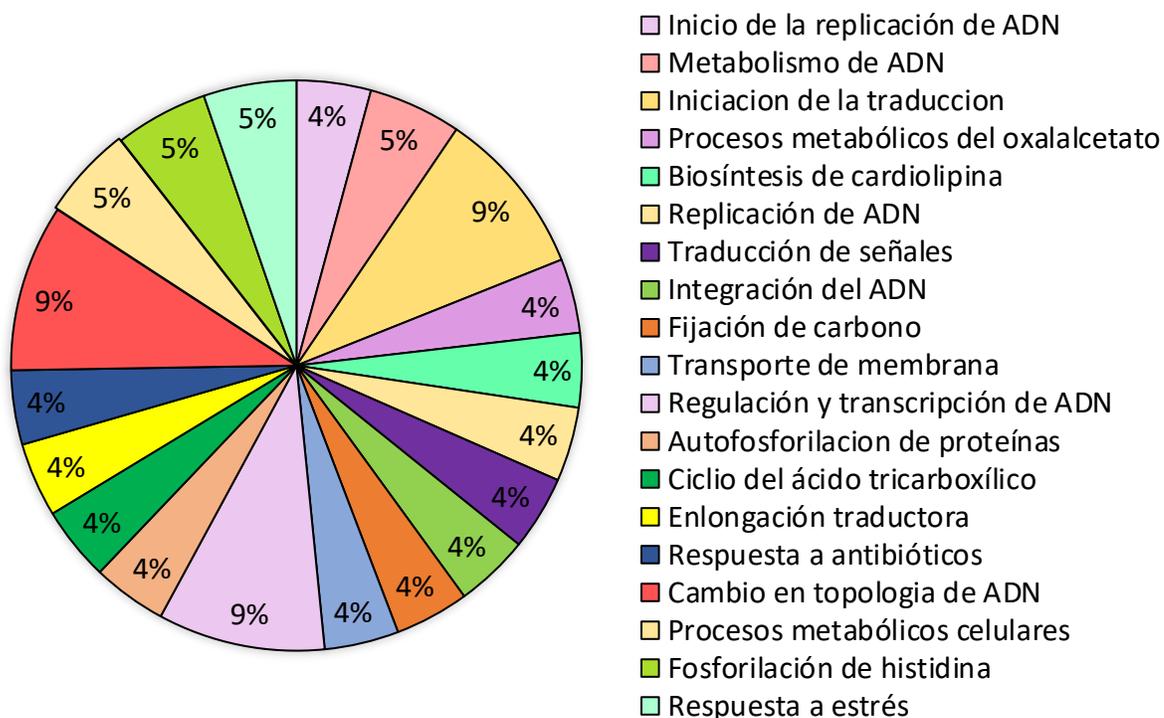


Figura 7. Anotación GO de los procesos biológicos, determinando la presencia de funciones como la integración del ADN en un 4.17 % de todas las secuencias y el ciclo de Krebs en un 4.17 % de ellas en el genoma completo de CIBGEN003.

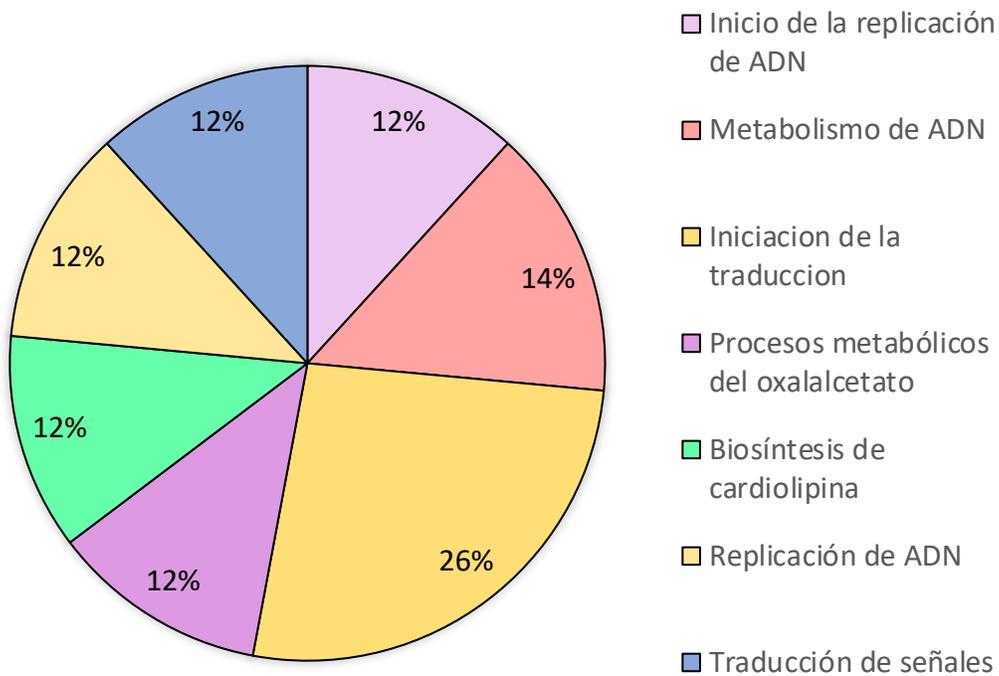


Figura 8. Anotación GO por componente celular, donde más del 47 % de las secuencias están involucrados en la síntesis de componentes integrales de la membrana y hasta un 14.29 % de ellas participan en la síntesis del citoplasma en el genoma completo de CIBGEN003.

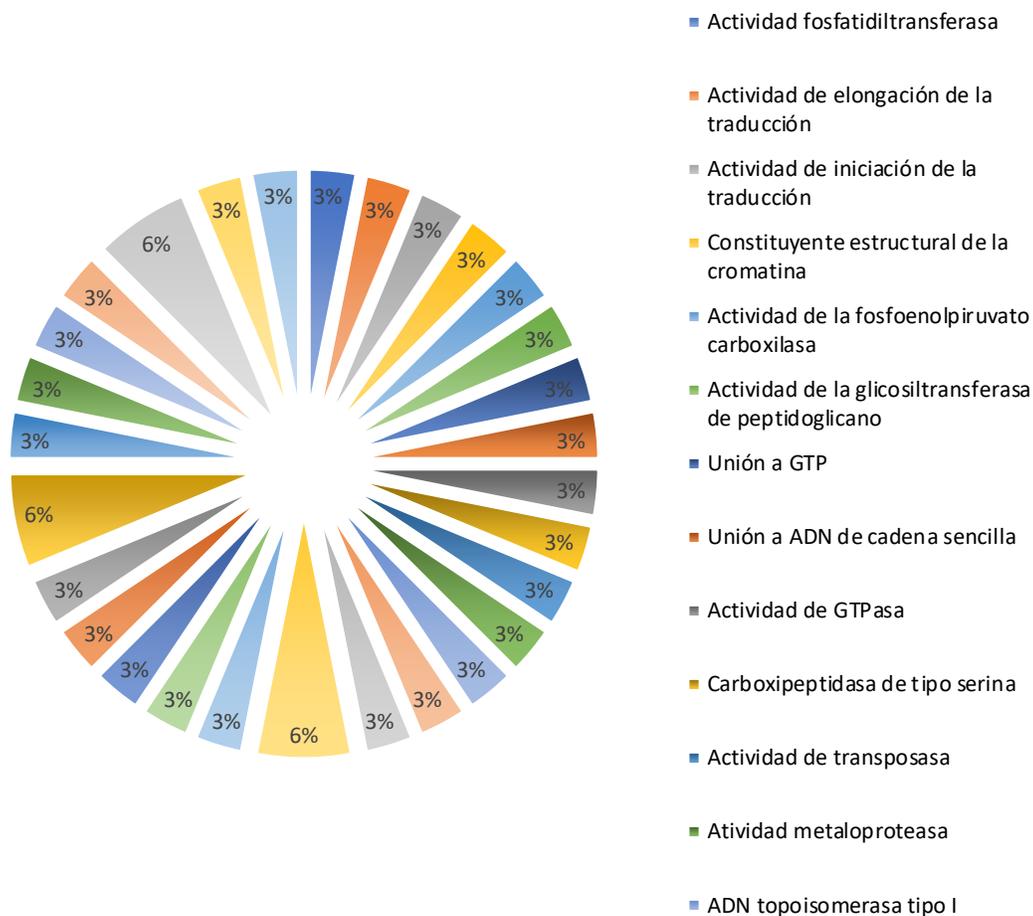


Figura 9. Anotación GO de la función molecular de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN 003, donde la abundancia de las funciones moleculares se encuentra en la unión de iones de magnesio con un 6.07 % de las secuencias del genoma completo de CIBGEN003.

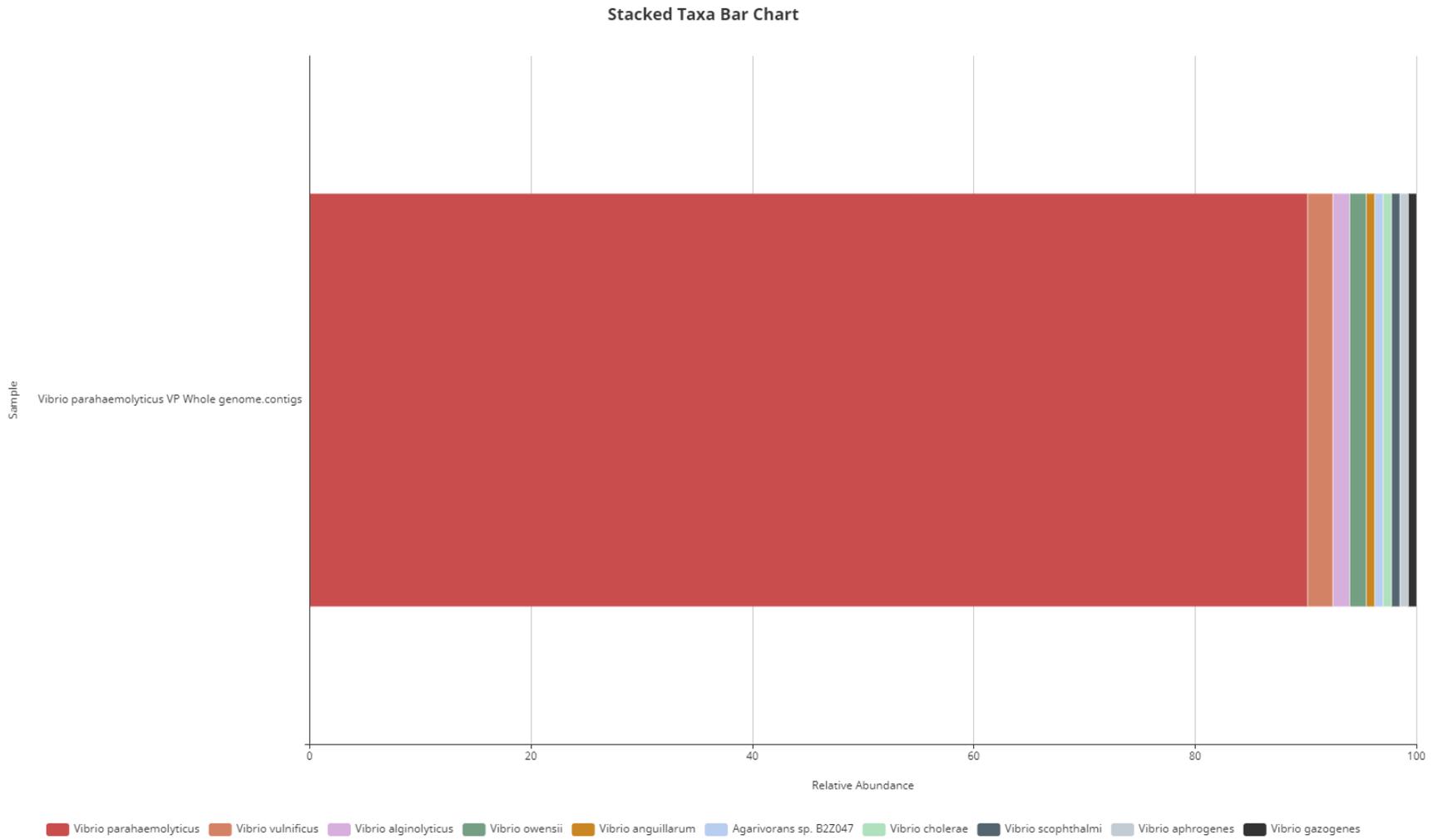


Figura 10. Homologia del genoma de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN 003.Go.

Tabla 7. Anotación EggNOG- Mapper del genoma de *V. parahaemolyticus* CIBGEN003, donde las secuencias proteicas son caracterizadas por su distribución.

información general	
Cantidad total de secuencias de entrada:	5033
Longitud media:	302
Número de secuencias anotadas go:	1748 / 34.73 %
Número de anotaciones go:	9154
Promedio de gos por secuencia:	5.24
 Distribución de categorías de cog	
 Almacenamiento y procesamiento de la información:	
transcripción (k):	350
Traducción, estructura ribosómica y biogénesis (j):	216
Replicación, recombinación y reparación (l):	186
Procesamiento y modificación del arn (a):	1
Estructura y dinámica de la cromatina (b):	0
Total:	762 / 16.29 %
 Procesos celulares y señalización	
Biogénesis de la membrana / envoltura de la pared celular (m):	273
Mecanismos de transducción de señales (t):	188
Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular (u):	130
Modificación postraduccional, tumor proteico, chaperonas (o):	129
Motilidad celular (n):	85
Mecanismos de defensa (v):	62
Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica (d):	60
Estructura nuclear (y)	0
Estructuras extracelulares (w):	0
Citoesqueleto (z):	0
Total:	927 / 19.81 %
 Metabolismo:	
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos (p):	254
Producción y conversión de energía (c):	248
Transporte y metabolismo de aminoácidos (e):	228
Transporte y metabolismo de coenzimas (h):	167
Transporte y metabolismo de carbohidratos (g):	161
Transporte y metabolismo de nucleótidos (f):	130

Transporte de lípidos y metabolismo (1):	101
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	53
(q):	
Total:	1342 / 28.68 %

7.6.2 Cromosoma I

El cromosoma I presenta un tamaño de 3.3 Mb, con genes que codifican a proteínas de fagos como *clpS* de (321 pb), *tmk* (633 pb), *NusA* (1488 pb), *MotA* (468 pb) y *RstA* (315 pb) esta última necesaria para la replicación del genoma del fago; así como también genes como *ihfA* (297 pb), *ihfB* (282 pb), *xerD* (918 pb), *tnpA* (198 pb) involucrados en la transferencia horizontal, estabilidad e integración de genes. Dentro de los más relevantes se encuentran aquellos involucrados en la resistencia a antibióticos como *TxR* posible regulador de transcripción que desempeña un papel en la concesión de resistencia a la tetraciclina, *CRP* betalactamasa, entre otros (6 proteínas de resistencia de 3081 regiones codificantes en total, presentes en el cromosoma.

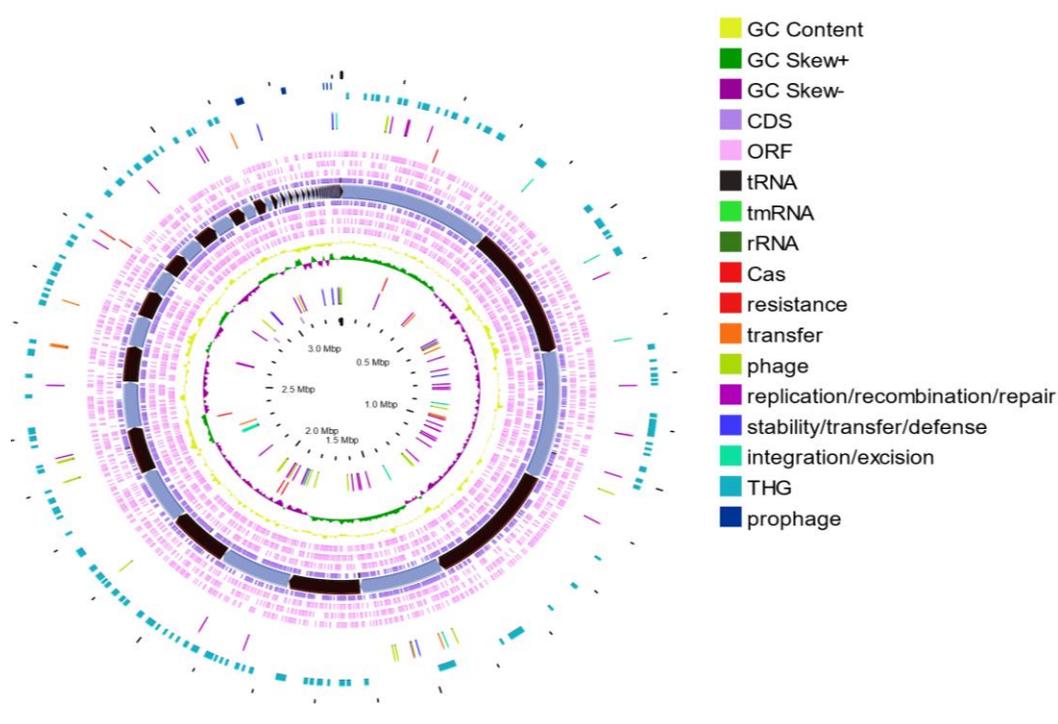


Figura 11. Cromosoma I de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003.

7.6.3 Cromosoma II

El cromosoma II presenta un tamaño aproximado de 1.5 MB, es el cromosoma de menor densidad génica, y contiene 1653 regiones codificantes, 2296 marcos de lectura abiertos, y un aproximado de 56 regiones involucradas en transferencia horizontal de genes dentro de estas regiones encontramos presentes genes como el que codifica a la pseudouridina metiltransferasa (600 pb) con funciones en la estabilidad del ARN, también el gen de la flavoproteína deshidrogenasa de transferencia de electrones es una enzima que transfiere electrones de la flavoproteína en la matriz mitocondrial al conjunto de ubiquinona en la membrana mitocondrial interna y es parte de la cadena de transporte de electrones. Resaltan 4 regiones, la primera ubicada rio arriba con un tamaño de 22,392 pb, la segunda región con un tamaño de 1,996 pb, la tercera 1,612 pb y la última siendo esta la de mayor longitud con un tamaño de 68,111 pb (Fig. 12) de afuera hacia adentro el segundo anillo, presenta 4 arcos color azul rey, estas fueron identificadas como profagos usando datos de predicción por la base de datos VirSorter, una herramienta diseñada para la detección de señales virales en diferentes tipos de secuencias de microorganismos.

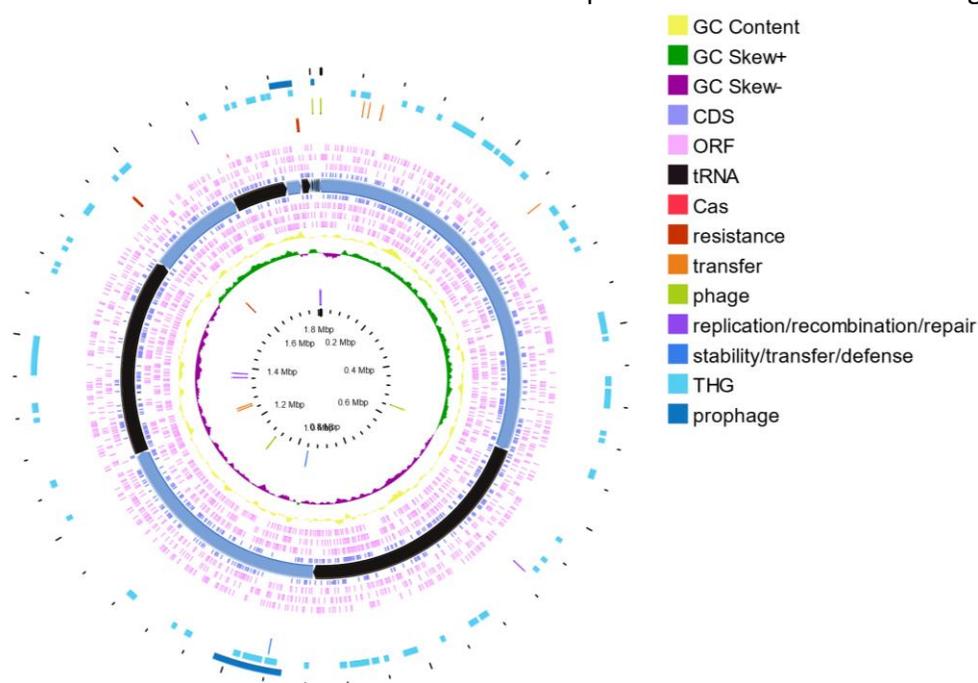


Figura 12. Cromosoma II de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003.

7.6.4 Plásmido

Vibrio parahaemolyticus presenta una región de integración con un tamaño de 2,982 pb que codifica a *tnpA*, una transposasa que permite el reordenamiento cromosómico al integrar y escindir genes además de la presencia del operón *trb*, involucrado en la conjugación bacteriana y la transferencia de genes, con un tamaño aproximado de 7,629 pb; estas regiones están altamente involucradas en la transferencia horizontal de genes. Asimismo, se pueden delimitar 114 regiones codificantes, con 135 marcos de lectura abiertos, cuenta además con un replicón de un tamaño de 840 pb río arriba, que le permite de acto individual iniciar el proceso de replicación de ADN o ARN, presentando diversas opciones para el ordenamiento cromosómico y la integración de genes. Se obtuvieron las islas génicas ubicadas en este plásmido, con funciones específicas de transferencia, replicación, recombinación, estabilidad, transferencia, reparación e integración y escisión de genes (Fig. 13).

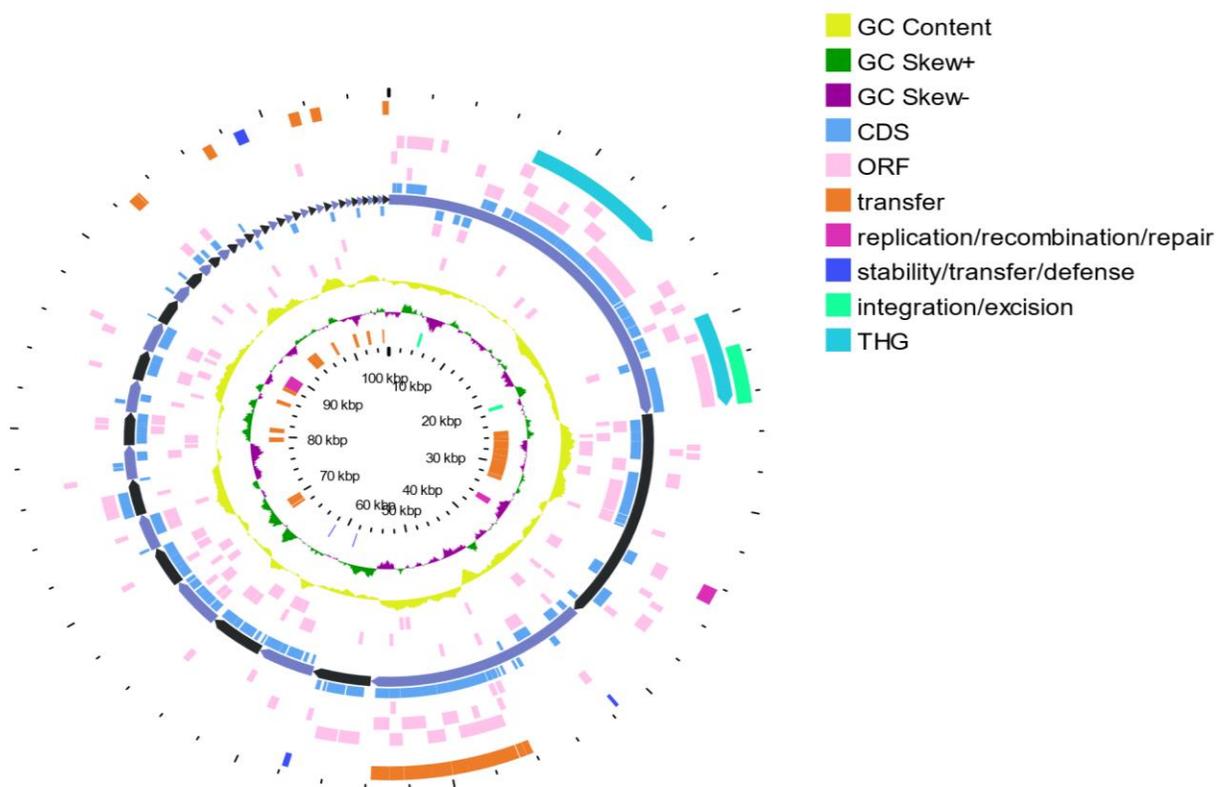


Figura 13. Regiones codificantes del plásmido bacteriano perteneciente a *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003.

7.6.5 Genoma bacteriófago vB_Vp_PvVp4

En el mapa lineal de la representación gráfica de la estructura del ADN del genoma del bacteriófago Vp04 (Fig. 14), donde resaltan 44 regiones codificantes, 47 marcos de lectura abiertos, así como homología a genes presentes en otros bacteriófagos, y genes involucrados en la replicación y recombinación. Como el gen 8, ubicado (490 pb - 2,022 pb), una proteína de portal.

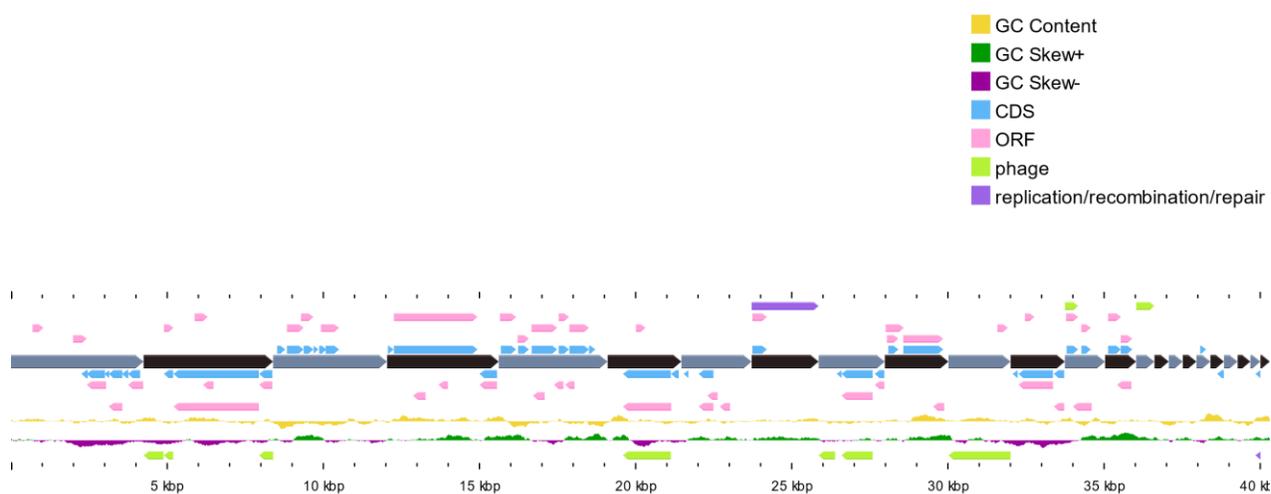


Figura 14. Visualización del genoma del fago vB_Vp_PvVp4.

7.7 Análisis transcriptómico

7.7.1 Preprocesamiento

La primera librería de ARN de la primera condición (VB3) presentó el valor de Q20 antes de su limpieza 97.51%, permitiendo validar después de la filtración de posibles errores y N, así como los adaptadores mismos, obteniendo una mejora en el valor Q20 de 97.60%; de igual forma los valores de Q30 cambian después de su limpieza, teniendo como valor final un Q30 de 92.94%. además, se puede diferenciar el número de secuencias inicial (16.337878 M) a su filtración, y el número final de lecturas que aprobaron los filtros 16.289526 representando esto un 99.70 % de las secuencias pertenecientes a la condición 1 de *Vibrio parahaemolyticus* CIBGEN003 sin infectar.

Tabla 8. Reporte obtenido en fastp de la primera librería de ARN de la primera condición VB3.

Versión fastp:	0.22.0 (HTTPS://GITHUB.COM/OPENGENE/EASTP)
Secuenciación:	paired end (150 ciclos + 150 ciclos)
Longitud media antes del filtrado:	150bp, 150bp
Longitud media después del filtrado:	149bp, 149bp
Tasa de duplicación:	35.5903114
Antes de filtrar	
Lecturas totales:	16.337878 M
Bases totales:	2.450682 G
Bases O20:	2.389881 G (97.6190174)
Bases O30:	2.274695 G (92.8199604)
Contenido GC:	46.0837274
Después del filtrado	
Lecturas totales:	16.289826 M
Bases totales:	2.439948 G
Bases O20:	2.381627 G (97.6097404)
Bases O30:	2.267715 G (92.9411134)
Contenido GC:	46.0838474
Resultado del filtrado	
Lecturas que pasaron el filtro:	16.289526 M (99.7040505)
Lecturas con baja calidad:	43.252000 K (0.264735 %)
Lecturas con demasiadas n:	4.950000 K (0.0302984)
Lecturas muy cortas:	150 (0.0009184)

Los archivos R1 y R2 de la primera librería de la condición 1 fueron preprocesados para eliminar aquellas secuencias con posibles errores, repeticiones o de baja calidad, fastp permitió un análisis de estas secuencias antes y después de su filtración generando una gráfica de relación de contenido de las bases, que permite ver el cambio en ciertos porcentajes de las bases nitrogenadas.

Los archivos obtenidos de salida, como él .fast.qz y .fq y un reporte de las secuencias por fastp permiten delimitar el contenido de las bases y mejorar su posible error después de cada limpieza, mostrando gráficos del radio del contenido de las bases secuenciadas, antes y después de pasar el filtro, destacan los niveles de secuencias de timina(T) antes de su limpieza con valores de 28.51 % y después 28.54%, con una corrección en el número de N, por repeticiones continuas en las lecturas de .003 %.

Después del preprocesamiento de la primera librería, se generaron los mismos archivos para la librería número dos de la primera condición y las librerías 3 y 4 de la condición numero dos; donde además de los archivos FASTA, logramos obtener curvas de relación del contenido de las bases, que nos permiten conocer nuestras secuencias y sus valores referentes a las bases y su porcentaje en cada una de ellas; en la Tabla 11 podemos delimitar el numero inicial de secuencias de los archivos R1 y R2 de la segunda librería de la primera condición(VB4) siendo este 19.869594 M en total, y una vez procesadas las lecturas su número final fue de 19.826892 (99.78 %).

El procesamiento de las lecturas en Fastp permite una filtración de aquellas lecturas con repeticiones o número elevado de N's, permitiendo mejorar así la calidad de estas, los valores Q20 y Q30 refieren ampliamente esto en el algoritmo, donde en la segunda librería de la primera condición podemos observar para Q20 un cambio de 97.71% a 97.77, Q30 de 93.16% a 93.25%.

Vale la pena señalar que algunos tipos de bibliotecas siempre producirán una composición de secuencia sesgada, normalmente al comienzo de la lectura. Las bibliotecas producidas usando hexameros aleatorios (incluyendo casi todas las bibliotecas RNA-Seq), y aquellas que fueron fragmentadas usando transposasas, contendrán un sesgo intrínseco en las posiciones en las que se lee (las primeras 10-12 bases). Si bien este es un verdadero sesgo técnico, no es algo que se pueda corregir y en la mayoría de los casos no parece afectar negativamente el análisis posterior (Ewels, P., M. Magnusson, S. Lundin, and M. Källner, 2016).

Tabla 9. Reporte obtenido en fastp de la segunda librería de la primera condición (VB4) células bacterianas sin infectar con bacteriófago.

Versión fastp:	0.22.0 (berb : //github.com/opengene/caste)
Secuenciación:	paired end (180 ciclos 150 ciclos)
Longitud media antes del filtrado:	150bp, 150bp
Longitud media después del filtrado:	149bp, 149bp
Tasa de duplicación:	37.6250864
Antes de filtrar	
Lecturas totales:	19.869594 m
Bases totales:	2.980439 g
Bases 020:	2.912206 g (97.7106394)
Bases 030:	2.776748 c (93.1657204)
Contenido GC:	45.9965184
Después del filtrado	
Lecturas totales:	19.826892 m
Bases totales:	2.969136 g
Bases 020:	2.903054 g (97.7743654)
Bases 030:	2.768795 g (93.2525354)
Contenido GC:	45.9912924
Resultado del filtrado	
Lecturas que pasaron el filtro:	19.826892 m (99.7850894)
Lecturas con baja calidad:	36.182000 x (0.1820974)
Lecturas con demasiadas n:	6.188000 x (0.0311434)
Lecturas muy cortas:	332 (0.0016714)

El preprocesamiento de las lecturas de ambas condiciones, donde al final se generaron cuatro librerías (VB3 y VB4) para las lecturas de las muestras de *Vibrio parahaemolyticus* sin infectar y (VF3 y VB4) para las lecturas de las muestras de *Vibrio parahaemolyticus* bajo infección lítica por el fago Vp04, en la Tabla 12 se muestran las 4 librerías con su número final de lecturas que pasaron los filtros y valores Q30 y Q20 finales.

Tabla 10. Reporte de calidad de las secuencias y preprocesamiento de las librerías de RNA-seq.

Condición 1		Condición 2	
Células de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Lecturas que pasaron el filtro	Células de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> infectadas por el fago Vp04	Lecturas que pasaron el filtro
VB3 R1	16.28 M	VB3 R1	17.37 M
	99.70% de las secuencias		99.72 % de las secuencias
VB3 R2	GC 46 %	VB3 R2	GC 46.11 %
	Q20 97.60 %		Q20 97.61 %
	Q30 92.94 %		Q30 92.94 %
VB4 R1	19.82 M	VB4 R1	14.97 M
	99.78 % de las secuencias		99.81 % de las secuencias
VB4 R2	GC 45.99 %	VB4 R2	GC 46.09 %
	Q20 97.77 %		Q20 98.01 %
	Q30 93.25 %		Q30 93.87 %

7.7.2 Diseño experimental y normalización de las secuencias de ARN procesadas

Cada muestra fue procesada a partir de la condición experimental que se estableció, donde se ordenan la muestras que corresponde al ARN de la bacteria sin infectar e infectada con el vibriofago.

Tabla 11. Diseño experimental de las librerías de ARN obtenidas

Muestra	Tamaño de librería (antes del filtrado)	Tamaño de librería (después del filtrado)	Normalización de factores	Condición
VBF3	1829	1829	1.057	Fago_vs_bacteria
VBF4	1902	1902	0.925	Fago_vs_bacteria
VB3	1770	1770	0.977	Bacteria
VB4	2057	2057	1.047	Bacteria

Las librerías procesadas fueron analizadas por un gráfico de componentes principales, para así obtener el porcentaje de varianza entre ellas, donde se delimita un porcentaje del 16 % para el PC2, mientras que PC1 del 73% de varianza que permite diferenciar los grupos que contienen solo a la bacteria y aquellos con fago-bacteria.

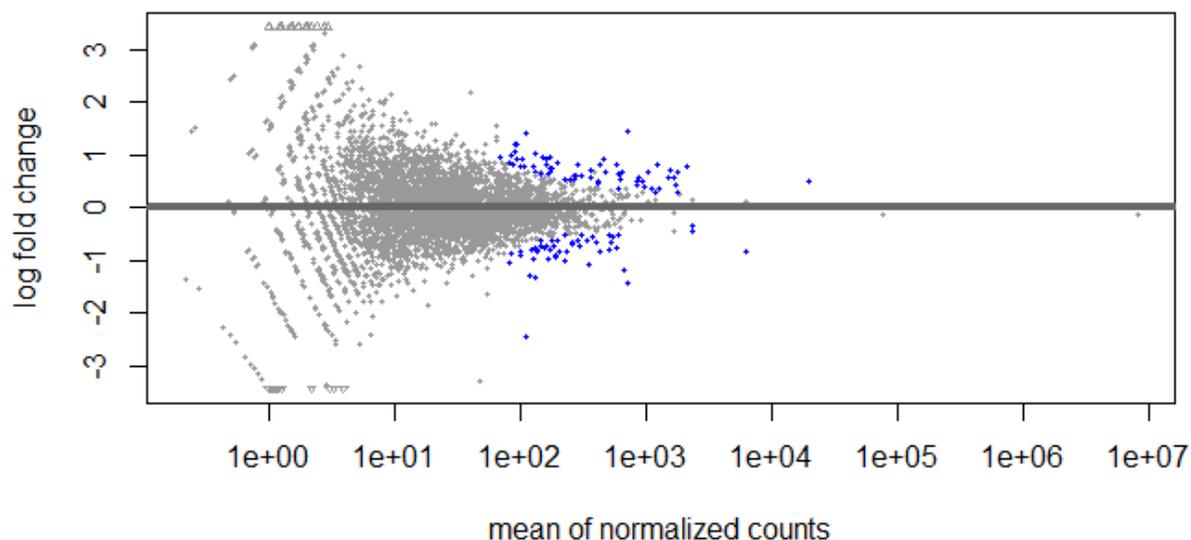


Figura 15. log fold change con un valor de P ajustado del 0.05 del total de las matrices de expresión diferencial generadas a partir de los transcritos obtenidos y ensamblados al genoma completo.

Dentro de los 5,038 genes presentes en CIBGEN003, se obtuvieron las cuentas de cada uno de ellos ubicadas en los transcritos ya ensamblados, estos con una distribución parcial de cada una de las clases del genoma total (tabla 14) donde se ven involucrados 804 genes del metabolismo, 294 genes de energía y 249 genes involucrados en el procesamiento de proteínas, siendo estas con los índices más altos de genes involucrados en la infección del bacteriófago.

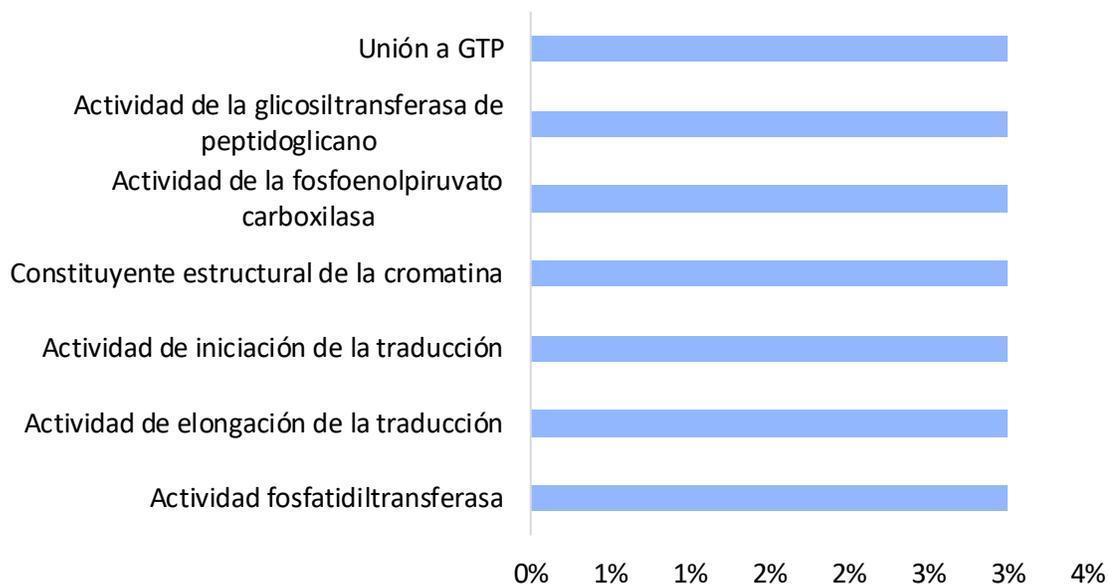


Figura 16. Distribución de transcritos por clase o función establecida.

Una vez obtenido los valores de log fold change de cada una de las matrices de genes obtenidas, se obtuvo una lista de aquellos 48 genes más diferenciales entre sí, donde se presentan valores de fold change de 1 a 5 (fig. 18). A partir de la obtención de los genes sobreexpresados y silenciados, se determinan las funciones proteicas de cada uno de los productos presentes en las secuencias, así como su valor de log fold change de los 73 transcritos con función validada (Fig. 16); donde un total de 43 elementos génicos se ven altamente expresados con referente al resto (Tabla 13) destacando aquellos proteínas involucradas en el transporte membranal y la producción de fosfolípidos, así mismo se obtuvo un gráfico de calor, delimitando las librerías generadas y su respectivo valor de expresión.

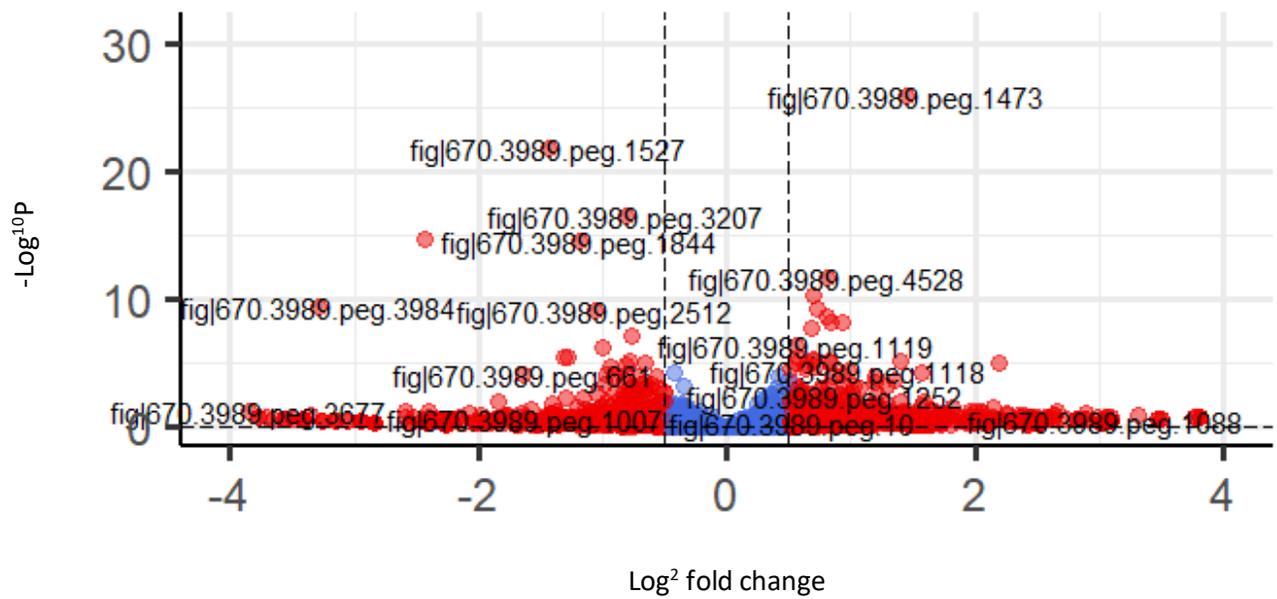


Figura 17. Volcano plot de los 5038 genes presentes en el genoma de *Vibrio parahaemolyticus*, donde destacan aquellos de la zona central (color azul) con un p value de 0.05.

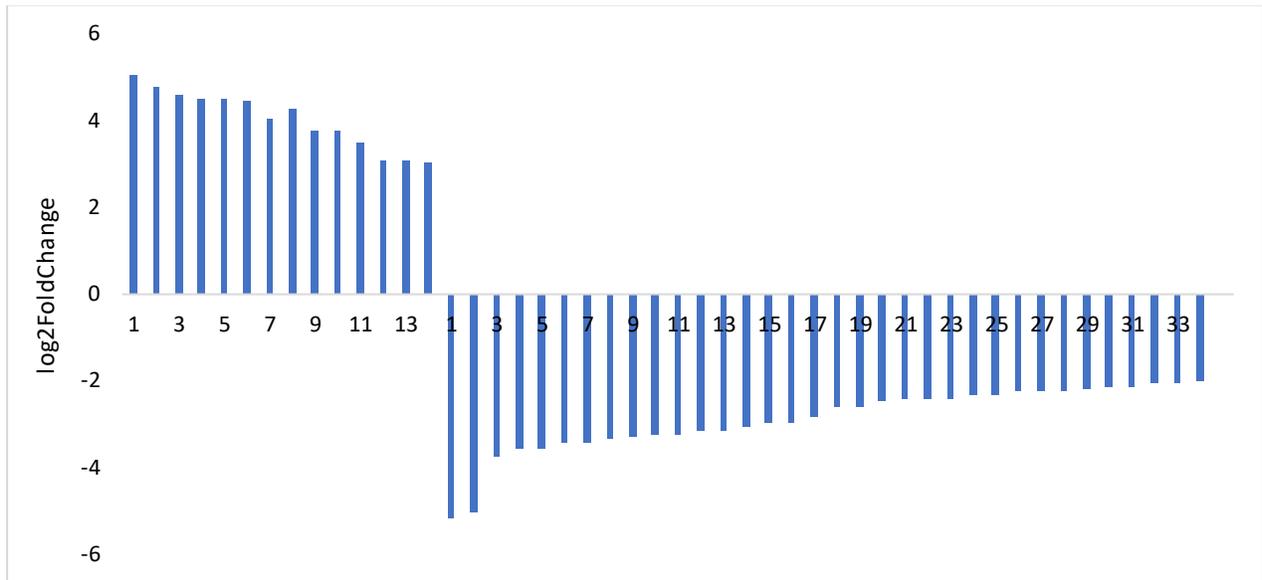


Figura 18. Valores Log Fold change de los transcritos silenciados y expresados en CIBGEN 003 *Vibrio parahaemolyticus*.

Tabla 12. Lista de proteínas expresadas en CIBGEN 003 *Vibrio parahaemolyticus*.

	Producto	Función celular	log2FoldChange
1	ATPasa de la clase AAA+	Energía	5.041596593
2	Proteína clasificadora de lipoproteínas de la membrana externa	Transporte de membrana	4.774294903
3	Proteína IscX	Energía	4.614530171
4	Proteína efectora YopR	Patogenicidad	4.50842656
5	Proteína Msl2237	Transporte de membrana	4.487703384
6	2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa (EC 2.7.6.3)	Procesamiento de aminoácidos	4.445872906
7	Proteína portadora de acilo	Síntesis de lípidos	4.048630835
8	Proteína del cuerpo basal flagelar FlgG	Virulencia	4.267034383
9	Bomba de Na(+) de decarboxilasa de oxaloacetato, cadena gamma (EC 4.1.1.3)	Energía	3.791133052
10	Proteína de la superfamilia tipo ferritina	Respuesta a estrés	3.77437301
11	Proteína del anillo L flagelar FlgH	Virulencia	3.477442201
12	Proteína asociada al transportador de hierro ferroso FeoA	Energía	3.10406849
13	Proteína de la membrana interna YjiG	Metabolismo celular	3.09478105
14	Transportador ABC de arginina, proteína de unión a ATP ArtP	Energía	3.048643601

Tabla 13. Lista de proteínas silenciadas en CIBGEN 003 *Vibrio parahaemolyticus*

	Producto	Ruta metabólica	log2FoldChange
1	Transportador, familia LysE	Transporte de membrana	-5.150230241
2	2-dehidro-3-desoxigluconocinasa (EC 2.7.1.45)	Energía	-5.025377447
3	N-acetilglutamato quinasa (EC 2.7.2.8)	Biosíntesis de metabolitos secundarios	-3.767151934
4	protein pndA	Procesamiento de ARN	-3.57673839
5	Proteína chaperona YscY	Transporte de membrana	-3.561596351
6	Transportador ABC	Transporte de membrana	-3.415863771
7	Acetiltransferasa	Procesamiento de proteínas	-3.415863771
8	proteína PipP de biogénesis de pili tipo IV	Síntesis flagelar	-3.35527855
9	Dehidratasa de prefenato (EC 4.2.1.51)	Biosíntesis de metabolitos secundarios	-3.282965729
10	Motb	Síntesis flagelar	-3.255136605
11	Factor de elongación de la transcripción GreB	Procesamiento de ADN	-3.255136605
12	Glicosiltransferasa	Transporte celular	-3.146043153
13	Regulador transcripcional MerR	Procesamiento de ADN	-3.146043153
14	Proteína PilN de biogénesis de pili tipo IV	Síntesis flagelar	-3.04936409
15	DesHidratasa de (3R)-hidroximiriostoil-[ACP] (EC 4.2.1.-)	Biosíntesis de ácidos grasos	-2.950615856

16	Proteína reguladora P-II	Regulación de Nitrogeno	-2.950615856
17	Acetiltransferasa grupo amino	Síntesis de aminoácidos	-2.840474805
18	Proteína YhiN	Unión FAD/NAD(P)	-2.596091968
19	Ligasa propionato-CoA (EC 6.2.1.17)	Metabolismo de lípidos	-2.591502228
20	Transportador ABC de ferricromo (permeasa) PvuD	Transporte de membrana	-2.445796915
21	Acetiltransferasa putativa de alanina para ribosomas	Procesamiento de proteínas	-2.415814711
22	FOG: Proteína con repeticiones TPR	Patogenicidad	-2.40783922
23	Sistema PTS, componente IIA	Transporte de membrana	-2.404778636
24	Transportador ABC	Transporte de membrana	-2.332569738
25	Proteína probable de utilización de hemo-hierro	Patogenicidad	-2.307535405
26	Componente (ImpM) TagF asociado al T6SS	Patogenicidad	-2.255970694
27	ATPasa de segregación cromosómica	Procesamiento de ADN	-2.255970694
28	Proteína YscQ	Síntesis flagelar	-2.230387611
29	Sintasa de fosfatidilglicerofosfato	Transporte de membrana	-2.188360323
30	Proteína TrbJ	Transferencia conjugativa	-2.14958358
31	Regulador de respuesta	Respuesta celular	-2.12198354
32	sulfurtransferasa de 3- mercaptopiruvato (EC 2.8.1.2)	Metabolismo de aminoácidos	-2.071161074
33	Proteína YcgL	Procesamiento de ARN	-2.033391992

8. DISCUSION

Las especies marinas del género *Vibrio* abundan especialmente en ambientes marinos salinos, cálidos y calientes siendo esto un factor importante de apoyo para su crecimiento poblacional, llegando a ser una de las principales limitantes en la industria de la acuicultura (Novriadi, R., 2016). El efecto de la salinidad en ambientes marinos es fundamental para su crecimiento; Tokuhiro N., Masamichi W., et al, en el 2003 registraron el crecimiento de cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* como la O3 : K6 y O1 : K bajo distintas concentraciones de salinidad (1%, 3% y 7% de NaCl) indicando su óptimo crecimiento a 25° Celsius el 1% y 3% NaCl, mientras que al 7% el crecimiento de bacterias decreció inicialmente para después aumentar lentamente su población a las 12 horas, demostrando que algunas poblaciones no logran sobrevivir en concentraciones tan elevadas de NaCl. En el presente estudio la evaluación de la cepa *Vibrio parahaemolyticus* (CIBGEN003) mediante su cinética microbiana determino desde la hora 05 su óptimo crecimiento a partir de un medio con concentraciones de salinidad del 2.5% de NaCl (Fig. 1), llegando a un máximo poblacional de 1.2×10^9 cel/mL a las 30 horas de su evaluación. *V. parahaemolyticus* presenta una plasticidad cromosómica, representada por los elementos estructurales que componen su organización cromosómica incluido el plásmido contenido en su genoma, un super integron (SI) en su cromosoma II e islas génicas dispersas por ambos cromosomas, esto le permite tener una ventaja adaptativa. Mediante su metabolismo, la cepa CIBGEN003 fue capaz de tolerar distintos rangos de salinidad, también la capacidad de crecer a distintas temperaturas que van desde los 15 a 45°C, la adaptabilidad de esta especie a condiciones adversas es aprovechada en alto grado para su proceso de patogenicidad, a diferencia de lo reportado por Vos P. et al. (2011) quienes observaron en otras especies como *V. Cholerae* era incapaz de tolerar concentraciones de Cloruro de Sodio (NaCl) de 6% y 8%, o *V. furnissi* con supervivencia nula a temperaturas de 42 C°.

A diferencia de otras especies halófilas, *V. parahaemolyticus* es Lac (-), donde se ha referido que esto tiene una repercusión importante en el desarrollo óptimo de la bacteria ya que la susceptibilidad de agentes microbianos distingue de cepas positivas y negativas a la fermentación

de lactosa (Tabla 3); por ejemplo aquellas Lac (+) que son sensibles a la penicilina, ampicilina y carbenicilina y resistente a la colistina, mientras que *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* son resistentes a la penicilina, carbenicilina y ampicilina (Brumfield, K. D., et al., 2021). En cuanto a la producción de catalasa son 2 los genes responsables de la producción de esta enzima (ubicados dentro del genoma completo como: KatE 435721pb -437160pb y KatG 132984pb -135158pb) siendo la cepa CIBGEN003 una especie reactiva de oxígeno (ROS) la catalasa es determinante para la síntesis de componentes celulares, incluyendo proteínas, ADN y lípidos de membrana; se ha demostrado que en diversos escenarios de estrés ambiental el nivel de superóxido-disminutasa (SOD) y catalasa se ven reducidos, aumentando la susceptibilidad de bacterias al estrés oxidativo, autores como Chen, C. et al., 2016 determinaron que el nivel de ROS intracelular se relaciona con la supervivencia de *V. parahaemolyticus* bajo condiciones a bajas temperaturas, inanición y baja salinidad.

Por otra parte, la función de ciertos factores anti oxidativos como la enzima catalasa permite potenciar la virulencia de patógenos en distintos organismos e inclusive permite un crecimiento óptimo en presencia de bacterias competidoras (Baker-Austin, C., 2018). La cepa CIBGEN 003 presenta en su genoma genes que codifican la enzima catalasa, ubicados en el cromosoma II así como su corroboración en pruebas bioquímicas, permite no solo confirmar la patogenicidad y competitividad de la bacteria en este estudio, sino también permite identificar aquellos factores que le otorgan cierta supervivencia ante diversas condiciones ambientales, *Vibrio parahaemolyticus* no sólo es una bacteria con gran plasticidad metabólica; debido a que su nicho microbiano ejerce una gran presión selectiva presenta también una alta variabilidad genómica, delimitada por los elementos génicos dispersos en sus cromosomas y específicamente en su plásmido (Fig. 13) que incorpora islas génicas de transferencia horizontal, integración, replicación, recombinación y reparación de genes; estudios como el de Chen Y. et al. 2011 demuestran que las principales variaciones entre las islas de patogenicidad y elementos móviles presentan una alta probabilidad de impulsar la evolución de *Vibrio parahaemolyticus* y aunque el estudio de la coevolución bacteria-fago está todavía en su infancia, se ha demostrado que las comunidades

bacterianas se ven afectadas por los bacteriófagos marinos esto da forma a la evolución de rasgos bacterianos ecológicamente relevantes, mediante la coevolución se puede mantener la diversidad fenotípica y genética, aumentar la tasa de evolución y divergencia bacteriana y viral (Koskella B., 2014). Basado en la comparación con otros vibriofago, Vp04 presenta un periodo de latencia menor (50 minutos) con referencia a otros como Vp15p con 70 minutos, Vp17p 55 minutos, Vp25P con hasta 90 minutos y Vp33P con 65 minutos (Hidaka y Tokushige, 1978; Alagappan et al. 2010; Yamaki et al. 2015; Matamp and Bhat, 2019), implicando un mayor tiempo en la lisis bacteriana y liberación de progenie viral.

De acuerdo con Kropinski et al., 2009, la determinación de la concentración de partículas de fagos infecciosos y su huésped son fundamentales para conocer el ciclo de vida del bacteriófago sobre la bacteria, siendo determinantes los tiempos de eclipse y latencia que en el presente estudio refieren alta susceptibilidad bacteriana en *V. parahaemolyticus* a su respectivo vibriofago. La duración de los períodos de eclipse y latencia, fueron necesarios para la determinación y caracterización de la infección bacteria-fago y su etapa en proceso infectivo mediante RNA-seq al minuto 10.

La secuenciación de ARN (RNA-Seq) ha sido empleado por diversos autores para ampliar el panorama de los efectos de las interacciones fago-huésped por medio de cambios en la transcripción con respecto al tiempo, Li X., 2022 empleó esta herramienta para investigar el efecto global del fago HH109 en el transcriptoma de *V. alginolyticus*, determinando genes de transcripción temprana y aquellos de transcripción tardía como los genes de la proteína de cola (gp46), la cápside mayor(gp45) del bacteriófago. Se encontraron también genes cuya expresión se vio alterada, involucrados en la biosíntesis de ácidos nucleicos, como la subunidad alfa de la ribonucleasa difosfato-reductasa (nrdA) y la subunidad beta (nrdB) siendo estos homólogos importantes en el fago t4 (Champe, S. P. 2019); además de la helicasa IV de ADN bacteriana (helD) y el regulador transcripcional ycnC (familia TetR/AcrR), presentes también en *V. parahaemolyticus*; Para este estudio, se consideró el proceso de infección en el minuto 10

después de la exposición del vibriofago Vp4 a *V. parahaemolyticus* denotando la alta capacidad liberar su progenie y lisar la célula bacteriana a los 20 min. (Fig. 2). Para el diseño experimental se consideró como etapa media el minuto 10 de la infección. Según Warden, C. D., Yuan, Y. C., y Wu, X. (2013) al emplear secuenciación de ARN (RNA-Seq) para identificar un número limitado de genes en su posterior validación, un factor importante para la selección del gen candidato es el valor log₂FoldChange para la expresión entre dos grupos. La infección del fago Vp04 a su huésped *V. parahaemolyticus* (CIBGEN003) dio como resultado expresión diferencial de genes relevantes del proceso infectivo, expresándose de manera positiva aquellas involucradas en la obtención y transporte de energía (ATPasa de la clase AAA+, Proteína IscX, Bomba de Na⁽⁺⁾, cadena gamma ([EC 4.1.1.3](#)), la proteína asociada al transportador de hierro ferroso(FeoA) así como también el transportador ABC de arginina ArtP ; siendo arginina es un aminoácido esencial para el procesamiento de proteínas este actúa como una molécula precursora para la biosíntesis de los aminoácidos, poliaminas y óxido nítrico, también se convierte en una fuente de nitrógeno en su degradación a través de distintas rutas (Charlier, D., y Glansdorff, N., 2004); estas proteínas así como las involucradas en el transporte membranar, son empleadas por bacterias en supervivencia que requieren reprogramar el metabolismo bacteriano mediante regulaciones de la transcripción en vías metabólicas clave, la síntesis de aminoácidos como arginina así como también el contenido de metabolitos intracelulares pertenecientes a procesos que también podrían significativamente afectar la fisiología celular (Skliros, D., *et al.* 2021).

La infección viral exitosa depende de un mecanismo de entrada eficiente, involucrando muchos elementos de la superficie bacteriana, según Chatterjee, S., y Rothenberg, E., 2012, proteínas con funciones relacionadas con los nutrientes localizadas en el espacio periplasmático pueden actuar como conductos naturales para que el ADN del fago entre en el citoplasma, hace sentido que en este estudio durante dicha infección se encuentren expresadas altamente aquellas proteínas de membrana con función de transporte o canal al citoplasma de la bacteria, encontradas en el transcriptoma como proteína Msl2237, la proteína clasificadora de lipoproteínas de la membrana

externa, proteína de la membrana interna YjiG, proteína portadora de acilo y la 2-amino-4-hidroxi-6-hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa ([EC 2.7.6.3](#))(Tabla 13).

Según Esteves, N. C., y Scharf, B. E., 2022, hay bacteriófagos que utilizan los flagelos bacterianos para su unión, estos son de particular interés debido al intercambio evolutivo único que obligan a sus huéspedes: la regulación o la abolición de la motilidad para escapar de la infección por un fago flagellotrópico, ya que una bacteria patógena también es capaz de atenuar su virulencia para escapar de la infección; CIBGEN003 presenta altamente expresadas aquellas proteínas involucradas en la síntesis flagelar, como lo son FlgG y FlgH, capaces de formar estructuras flagelares diversas sienta esto importante para la evasión de bacteriófagos (Montemayor, E, 2021).

Así se determina como resultado en un efecto de respuesta viral, empleando el silenciamiento de ciertos genes bacterianos de mantenimiento, como aquellos del transporte de energía, procesamiento de proteínas, producción de metabolitos secundarios, respuesta celular, metabolismo de aminoácidos y lípidos, procesamiento de ADN y ARN, síntesis flagelar, regulación de nitrógeno, entre otros (Tabla 14).

En resumen, este estudio ofrece una visión detallada de varios aspectos de *Vibrio parahaemolyticus*, desde su crecimiento en diferentes condiciones ambientales hasta su interacción con su vibriofago y su plasticidad genómica. Este tipo de estudios son importantes para comprender mejor la biología y ecología de esta bacteria, así como para desarrollar estrategias de control en entornos acuáticos y aplicaciones en biotecnología genómica.

9. CONCLUSIONES

1) El determinar los tiempos de latencia y liberación de progenie, permitió determinar el momento en el cual se debería de llevar a cabo la extracción de RNA para un mayor entendimiento de la expresión génica de la bacteria durante el proceso de infección.

2) El análisis del transcriptoma bacteriano durante el proceso de infección permitió delimitar aquellos genes que se vieron alta y bajamente expresados por la inclusión del genoma viral del vibriofago.

3) Durante el proceso de infección se observó el silenciamiento de genes claves de metabolismo y obtención de energía bacteriana.

4) El análisis transcríptico determino el numero genes silenciados durante la infección del vibriofago, lo cual, representa una baja expresión en proteínas sintetizadoras de nucleósidos, con actividad antimicrobiana y antiviral.

10. LITERATURA CITADA

- Abedon, S. T. (2009). Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(7): 807–815.
- Alagappan, K. M., Deivasigamani, B., Somasundaram, S. T. y Kumaran, S. (2010). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Current Microbiology*, 61(4): 235-240.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F. y Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. Infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1): 1-19.
- Blasdel, B. G., Ceysens, P. J., Chevallereau, A., Debarbieux, L. y Lavigne, R. (2018). Comparative transcriptomics reveals a conserved bacterial adaptive phage response (BAPR) to viral predation. *BioRxiv*, :248849. Doi: 10.1101/248849
- Brumfield, K. D., Usmani, M., Chen, K. M., Gangwar, M., Jutla, A. S., Huq, A. y Colwell, R. R. (2021). Environmental parameters associated with incidence and transmission of pathogenic *Vibrio* spp. *Environmental Microbiology*, 23(12): 7314-7340.
- Boyd, C. M., Angermeyer, A., Hays, S. G., Barth, Z. K., Patel, K. M. y Seed, K. D. (2021). Bacteriophage ICP1: A persistent predator of *Vibrio cholerae*. *Annual Review of Virology*, 8(1): 285-304.
- Buckling, A. y Rainey, P. B. (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1494): 931-936.
- Bzowska, A., Kulikowska, E. y Shugar, D. (2000). Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology y therapeutics*, 88(3): 349-425.
- Calder, T., de Souza Santos, M., Attah, V., Klimko, J., Fernandez, J., Salomon, D., Krachler, A. M. y Orth, K. (2014). Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 361(2): 107–114.
- Calder, T., Kinch, L. N., Fernandez, J., Salomon, D., Grishin, N. V. y Orth, K. (2014). *Vibrio* Type III effector VPA1380 is related to the cysteine protease domain of large bacterial toxins. *PLoS ONE*, 9(8): e104387. Doi:10.1371/journal.pone.0104387
- Charlier, D. y Glandsdorff, N. (2004). Biosynthesis of arginine and polyamines. *EcoSal Plus*, 1(1): 10-1128. Doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.10
- Chen, Y., Stine, O. C., Badger, J. H., Gil, A. I., Nair, G. B., Nishibuchi, M. y Fouts, D. E. (2011). Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC Genomics*, 12(20119): 1-13.
- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T. y Kanzaki, H. (2017). The roles of probiotic purple nonsulfur bacteria to control water quality and prevent acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) for enhancement growth with higher survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during cultivation. *Aquaculture*, 473: 327-336.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczeniak, M. W., Gaffney, D J., Elo, L. L., Zhang, X. y Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, 17: 1-19.

- Correa Velez, K. E., y Norman, R. S. (2021). Transcriptomic analysis reveals that municipal wastewater effluent enhances *Vibrio vulnificus* growth and virulence potential. *Frontiers in Microbiology*, 12: 754683.
- Dennehy, J. J. y Abedon, S. T. (2021). Phage infection and lysis. En: *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Germany: Springer International Publishing, pp. 341-383.
- Doron, S., Melamed, S., Ofir, G., Leavitt, A., Lopatina, A., Keren, M., Amitai, G. y Sorek, R. (2018). Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*, 359(6379): eaar4120.
- Dy, R. L., Richter, C., Salmond, G. P. C. y Fineran, P. C. (2014). Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, 1(1): 307–331.
- Esteves, N. C. y Scharf, B. E. (2022). Flagellotropic bacteriophages: opportunities and challenges for antimicrobial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13): 7084.
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Aranguren, L. F. y Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of acute hepatopancreatic necrosis disease natural mutants, pirABvp (-) *V. parahaemolyticus*, and pirABvp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture*, 470: 84-90.
- Hampton, H. G., Watson, B. N. J. y Fineran, P. C. (2020). The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature*, 577(7790): 327–336. Doi: 10.1038/s41586-019-1894-8
- Hobbs, Z. y Abedon, S. T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters*, 363(7): fnw047.
- Hör, J., Gorski, S. A. y Vogel, J. (2018). Bacterial RNA biology on a genome scale. *Molecular Cell*, 70(5): 785–799.
- Jia, B., Wang, T. y Lehmann, J. (2021). Peptidyl transferase center decompaction and structural constraints during early protein elongation on the ribosome. *Scientific Reports*, 11(1): 24061.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R. y Kaper, J. B. (1982). *Vibrio Parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 10(1): 77–124.
- Khairuldin, A. M., Ibrahim, I. K., Wakiyuddin, S. B., Wenning, Z., Lesley, A. O., Jakubovics, N.S. y Siew, W. C. (2014). Genome analysis of *Streptococcus gordonii* SK12. *Annals of Dentistry University of Malaya*, 21(2): 17-26.
- Kim, Y. K. y McCarter, L. L. (2000). Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 182(13): 3693–3704.
- Kodama, T., Yamazaki, C., Park, K. S., Akeda, Y., Iida, T. y Honda, T. (2010). Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *FEMS Microbiology Letters*, 311: 10–17.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. y Wolf, Y. I. (2017). Evolutionary genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 71: 233–261.
- Koskella, B. y Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria–phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5): 916–931. DOI: 10.1111/1574-6976.12072,

- Kronheim, S., Daniel-Ivad, M., Duan, Z., Hwang, S., Wong, A. I., Mantel, I., Nodwell, J. R. y Maxwell, K. L. (2018). A chemical defence against phage infection. *Nature*, 564(7735): 283-286.
- Li, X., Zhang, C., Jin, X., Wei, F., Yu, F., Call, D. R. y Zhao, Z. (2022). Temporal transcriptional responses of a *Vibrio alginolyticus* strain to Podoviridae phage HH109 revealed by RNA-Seq. *Msystems*, 7(2), e00106-22.
- Lenski, R. E. y Levin, B. R. (1985). Constraints on the coevolution of bacteria and virulent phage: A model, some experiments, and predictions for natural communities. *The American Naturalist*, 125(4): 585–602.
- Love, M. I., Huber, W. y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 1-21.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M. y Iida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*, 361: 743–749.
- Manning, A. J. y Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiology*, 11(1): 258.
- Montemayor, E. J., Ploscariu, N. T., Sanchez, J. C., Parrell, D., Dillard, R. S., Shebelut, C. W., Ke, Z., Guerrero-Ferreira, R. C. y Wright, E. R. (2021). Flagellar structures from the bacterium *Caulobacter crescentus* and implications for phage ϕ CbK predation of multiflagellin bacteria. *Journal of Bacteriology*, 203(5): 10-1128.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C. y Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1): 81-86.
- Ono, K., Akimoto, S. y Ohnishi, Y. (1987). Nucleotide sequence of the pnd gene in plasmid R483 and role of the pnd gene product in plasmolysis. *Microbiology and Immunology*, 31(11): 1071-1083.
- Oliveira, P. H., Touchon, M. y Rocha, E. P. C. (2014). The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Research*, 42(16): 10618–10631.
- Pal, C., Macia, M. D., Oliver, A., Schachar, I. y Buckling, A. (2007). Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450(7172): 1079-1081.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., y Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS One*, 10(5): e0126987.
- Rostøl, J. T. y Marraffini, L. (2019). Fighting phages: how bacteria resist their parasites. *Cell Host & Microbe*, 25(2): 184–194.
- Russell, D. A., Clokie, M. R. J., Kropinski, A. M. y Lavigne, R. (2018). Bacteriophages: methods and protocols. En: *Bacteriophages: methods and protocols*. Springer: New York, NY, USA. Vol. 3, pp. 109–125.

- Seed, K. D., Yen, M., Shapiro, B. J., Hilaire, I. J., Charles, R. C., Teng, J. E., Ivers, L. C., Boncy, J., Harris, J. B. y Camilli, A. (2014). Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *Elife*, 3: e03497.
- Pazhani, G. P., Chowdhury, G. y Ramamurthy, T. (2021). Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival, host colonization, and infection. *Frontiers in Microbiology*, 12: 737299.
- Skliros, D., Kalatzis, P. G., Kalloniati, C., Komaitis, F., Papathanasiou, S., Kouri, E. D., Udvardi, M. K., Kokkari, C., Katharios, P. y Flemetakis, E. (2021). The development of bacteriophage resistance in *Vibrio alginolyticus* depends on a complex metabolic adaptation strategy. *Viruses*, 13(4): 656.
- Soyer, O.S. (2012). *Evolutionary systems biology*. Springer, New York. ISBN 978-1-4614-3566-2
- Tagomori, K., Iida, T. y Honda, T. (2002). Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *Journal of Bacteriology*, 184(16): 4351–4358.
- Tzipilevich, E., Habusha, M. y Ben-Yehuda, S. (2017). Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. *Cell*, 168(1): 186-199.
- Van Houte, S., Buckling, A. y Westra, E. R. (2016). Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3): 745-763.
- Wicke, L., Ponath, F., Coppens, L., Gerovac, M., Lavigne, R. y Vogel, J. (2021). Introducing differential RNA-seq mapping to track the early infection phase for Pseudomonas phage ϕ KZ. *RNA Biology*, 18(8): 1099-1110.
- World Health Organization (WHO). (2011). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and technical report. *Microbiological Risk Assessment Series No. 16*. Rome. World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland.
- Zhou, D. (2017). Regulatory actions of ToxR and CalR on their own genes and type III secretion system 1 in *Vibrio parahaemolyticus*. *Oncotarget*, 8(39): 65809–65822.