

# **FACTORES DE VIRULENCIA EN AISLADOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DE TURKANA (KENIA)**

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

**Autor:** Irene Sogorb Quílez

**Tutora:** Consuelo Ferrer Rodríguez

**Cotutores:** M<sup>a</sup> Francisca Colom Valiente

**Curso académico:** 2024-2025

## Índice

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice .....                                                                        | 2  |
| Resumen y palabras clave.....                                                       | 4  |
| 1. Introducción.....                                                                | 5  |
| 2. Antecedentes, Hipótesis y Objetivos .....                                        | 9  |
| 2.1. Antecedentes.....                                                              | 9  |
| 2.2. Hipótesis.....                                                                 | 9  |
| 2.3. Objetivos.....                                                                 | 9  |
| 3. Materiales y Métodos .....                                                       | 10 |
| 3.1. Consideraciones éticas.....                                                    | 10 |
| 3.2. Selección de cepas .....                                                       | 10 |
| 3.3. Ensamblaje del genoma completo .....                                           | 11 |
| 3.4. Búsqueda de plásmidos .....                                                    | 11 |
| 3.5. Identificación de los factores de virulencia mediante BLAST .....              | 12 |
| 3.6. Estudio fenotípico .....                                                       | 12 |
| 3.6.1. Visualización de sideróforos, ROS y actividad lítica mediada por fagos ..... | 12 |
| 3.6.2. Ensayo presencia de biofilm.....                                             | 12 |
| 3.6.3. Ensayo fenotípico para detección de plásmidos .....                          | 13 |
| 3.6.4. Microscopía electrónica de barrido de Emisión de Campo (FESEM) .....         | 14 |
| 4. Resultados .....                                                                 | 15 |
| 4.1 Estudio de los factores de virulencia .....                                     | 15 |
| 4.1.1. Análisis genotípico de los factores de virulencia .....                      | 15 |
| 4.1.2. Análisis fenotípico de los factores de virulencia .....                      | 17 |
| 4.2. Estudio de la transferencia horizontal de genes.....                           | 20 |
| 4.2.1. Islas de patogenicidad .....                                                 | 20 |
| 4.2.2. Plásmidos .....                                                              | 22 |
| 4.2.3. Análisis de fagos .....                                                      | 23 |
| 5. Discusión .....                                                                  | 25 |
| 6. Conclusiones .....                                                               | 28 |
| 7. Proyecciones futuras .....                                                       | 29 |
| 8. Bibliografía: .....                                                              | 30 |

## Abreviaturas utilizadas

- EPS: Matriz extracelular polimérica
- PAO1: Cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
- FV: Factores de Virulencia
- IP: Islas de Patogenicidad
- FESEM: Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
- T2SS: Sistema de Secreción Tipo II
- T3SS: Sistema de Secreción Tipo III
- T4SS: Sistema de Secreción Tipo IV
- T6SS: Sistema de Secreción Tipo VI
- ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)
- LPS: Lipopolisacárido
- GC: Contenido en Guanina y Citosina
- PQS: *Pseudomonas* Quinolone Signal
- OD: Densidad Óptica
- D600/OD600: Densidad óptica a 600 nm
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- PHASTER: PHAge Search Tool Enhanced Release
- BHI: Brain Heart Infusion
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
- NCBI: National Center for Biotechnology Information
- VFDB: *Virulence Factors DataBase*
- CARD: *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

## Resumen y palabras clave

**Introducción:** *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista implicado en infecciones graves, especialmente en pacientes inmunodeprimidos. En este estudio se caracterizan genómica y fenotípicamente cuatro cepas clínicas asiladas en Turkana (Kenia) para identificar sus factores de virulencia (FV) y elementos genéticos móviles. **Materiales y métodos:** Se alinearon sus genomas completos con la cepa de referencia PAO1 y se analizaron genes de virulencia, islas de patogenicidad, fagos y plásmidos, mediante bioinformática. A nivel fenotípico, se evaluó la producción de sideróforos y pigmentos, actividad lítica mediada por fagos, formación de biofilm y presencia de exopolisacáridos. **Resultados:** El análisis genético reveló la presencia de múltiples FV en todas las cepas: adhesinas, flagelos, pili tipo IV, sistemas de secreción, producción de toxinas, sideróforos y elementos reguladores del *quorum sensing*, aunque con algunas diferencias. También se identificaron islas de patogenicidad y elementos genéticos móviles como plásmidos y fagos, incluyendo fagos filamentosos y líticos. Se observó una correlación entre la presencia de fagos filamentosos y la formación de biofilm. **Discusión:** Los resultados evidencian variabilidad genómica entre las cepas, y destacan el potencial de ciertos fagos como herramientas para fagoterapia. Este trabajo aporta información valiosa sobre *P.aeruginosa* en un entorno clínico con recursos limitados y refuerza la utilidad del análisis integrado genotípico-fenotípico.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, factores de virulencia, biofilm, fagos, transferencia horizontal.

## Abstract

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen involved in severe infections, particularly in immunocompromised patients. This study characterizes the genomic and phenotypic profiles of four clinical isolates from Turkana (Kenya) to identify their virulence factors (VFs) and mobile genetic elements. **Materials and methods:** The complete genomes were aligned with the reference strain PAO1, and bioinformatic tools were used to analyze virulence genes, pathogenicity islands, phages and plasmids. Phenotypic analyses included the production of siderophores and pigments, phage-mediated lytic activity, biofilm formation and detection of exopolysaccharides. **Results:** All isolates presented multiple VFs, including adhesins, flagella, type IV pili, secretion systems, toxins, siderophores, and *quorum sensing* regulators, with some strain-specific differences. Pathogenicity islands and mobile genetic elements such as plasmids and both filamentous and lytic phages were also identified. A correlation was observed between the presence of filamentous phages and enhanced biofilm formation. **Discussion:** The results highlight genomic variability among the isolates and suggest that certain phages may contribute to persistence and virulence. These findings provide relevant insights into *P.aeruginosa* from low-resource clinical setting and support the value of an integrated genotypic-phenotypic approach.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors, biofilm, phages, horizontal gene transfer.

## 1. Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa con forma de bacilo que se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente. Es un microorganismo ubicuo, puesto que se puede encontrar en agua, suelo y ambientes hospitalarios. Esto lo convierte en un patógeno de gran relevancia e interés [1].

Es un patógeno con gran capacidad de causar infecciones graves principalmente a individuos con el sistema inmunológico comprometido. Afecta a pacientes con inmunodeficiencias, enfermedades crónicas o que hayan sido sometidos a tratamientos médicos invasivos. Tiene capacidad para formar biopelículas en dispositivos médicos, como catéteres, que aumentan el riesgo de sufrir una infección grave. Las infecciones más severas y con peor pronóstico suelen ser de origen nosocomial, destacando neumonías, bacteriemias e infecciones en heridas quirúrgicas, quemaduras y vías urinarias. Además, es el principal agente causante de neumonías asociadas a ventilación mecánica e infecciones del tracto urinario en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs). Asimismo, *Pseudomonas aeruginosa* está implicada en infecciones crónicas que afectan a personas con fibrosis quística (FQ) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [2].

Tiene un tamaño de 2-4 µm de longitud y presenta un flagelo polar que le permite desplazarse en medios líquidos y pili tipo IV que le permite desplazarse sobre superficies sólidas mediante un movimiento por contracción [2].

Desde el punto de vista genómico, *Pseudomonas aeruginosa* tiene un tamaño que oscila entre 5,5-7 Mpb. La presencia de un genoma de gran tamaño le otorga versatilidad metabólica y capacidad para sobrevivir en condiciones adversas. Presenta un número elevado de genes conservados en su genoma comparado con otras bacterias [3].

### Factores de virulencia

*Pseudomonas aeruginosa* cuenta con una gran variedad de factores de virulencia que favorecen su capacidad patogénica. Estos factores de virulencia pueden formar parte de la estructura de la bacteria, como los flagelos, los pilis y el lipopolisacárido (LPS), o bien ser liberados al entorno, incluyendo enzimas, toxinas y pigmentos [2].

La producción de estos factores de virulencia está regulada por diversos sistemas de señalización que trabajan de manera conjunta, permitiéndole una gran capacidad de adaptación. Uno de los principales mecanismos es el *quorum sensing* (QS), un sistema de comunicación celular que regula la expresión de múltiples genes, incluyendo aquellos involucrados en la virulencia, formación de biofilm, resistencia a antibióticos y producción de toxinas [4].

El proceso de infección de *Pseudomonas aeruginosa* empieza con la adhesión a células epiteliales, donde participan diferentes estructuras superficiales como fimbrias, pili tipo IV y adhesinas específicas.

Estas estructuras permiten que la bacteria interactúe con los receptores del huésped, favoreciendo su colonización. Asimismo, en la defensa frente al sistema inmunológico al interferir con la fagocitosis, el lipopolisacárido (LPS) presente en su membrana externa juega un papel importante. Al mismo tiempo, la motilidad por *twitching*, mediado por los pili tipo IV, y la presencia de flagelo, participan en la propagación del microorganismo a través de los diferentes tejidos del huésped [5].

Una vez producida la adhesión, se inicia la secreción de diversas toxinas y enzimas que inducen daño en los tejidos y promueven la propagación de la infección. Una de las toxinas más significativas es la toxina A, puesto que inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas, dirigiéndolas a apoptosis. Además, *Pseudomonas aeruginosa* produce elastasas (*LasA* y *LasB*) y proteasas alcalinas, que descomponen componentes de la matriz extracelular, como elastina y colágeno, permitiendo así la invasión de los tejidos [6].

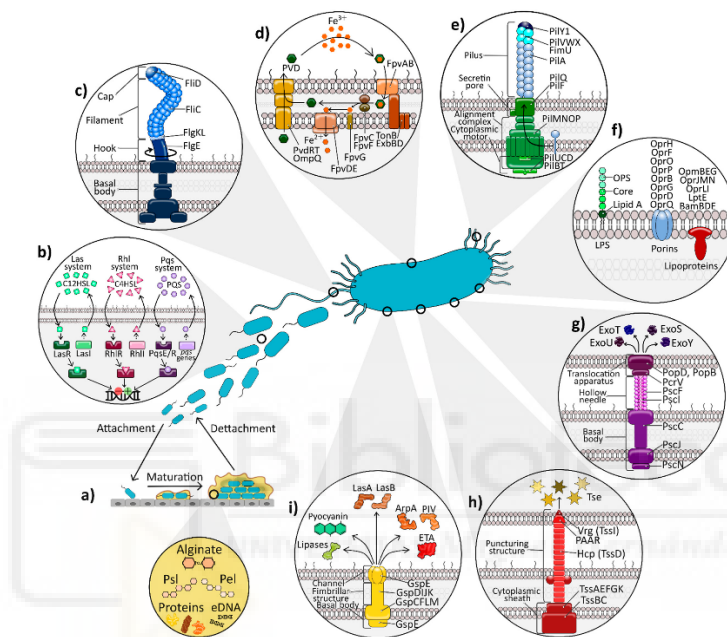
Otras toxinas producidas por esta bacteria incluyen las hemolisinas, que destruyen las membranas celulares al descomponer los fosfolípidos presentes [7].

*Pseudomonas aeruginosa* también produce diversos pigmentos con otras funciones adicionales a la pigmentación. La piocianina, que otorga color azul-verdoso, desempeña un papel crucial en la patogénesis al generar especies reactivas de oxígeno (ROS) [8]. Estas moléculas son altamente reactivas y pueden causar daño celular significativo. Otro pigmento producido es la pioverdina que presenta un color verde fluorescente. Este pigmento actúa como sideróforo captando hierro del entorno de la bacteria para promover el crecimiento bacteriano en condiciones donde la concentración de este nutriente es baja [9].

Además de la pioverdina, *Pseudomonas aeruginosa* puede producir piochelina, otro sideróforo que también tiene como función la captación de hierro del medio, pero con menor afinidad por este. Ambos aseguran la disponibilidad de este mineral para la supervivencia en entornos hostiles [9]. La liberación de los sideróforos está coordinada con sistemas de regulación de la virulencia, como el *quorum sensing*.

Un aspecto crucial en la patogénesis de *Pseudomonas aeruginosa* es su habilidad para generar biopelículas o biofilm, que son estructuras multicelulares rodeadas por una matriz extracelular compuesta principalmente por exopolisacáridos como alginato, *Psl* y *Pel*. La formación de biofilm no solo facilita la adhesión de la bacteria a superficies inertes y tejidos, sino que también confiere resistencia a los antibióticos y dificulta el reconocimiento por el sistema inmunitario, dificultando su erradicación. Esta estructura es fundamental en el desarrollo de infecciones crónicas como fibrosis quística o heridas crónicas [5].

Para liberar las toxinas y otros efectores, utiliza sistemas de secreción especializados, siendo el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) uno de los más representativos. Este sistema simula una jeringa molecular que inyecta toxinas directamente en las células huésped, pudiendo alterar los mecanismos moleculares y favoreciendo la propagación bacteriana. Algunas de las toxinas inyectadas son *ExoS* y *ExoT* que afectan el citoesqueleto celular; *ExoU* presenta actividad citotóxica y *ExoY* interfiere con la señalización intracelular [10]. No obstante, *Pseudomonas aeruginosa* también emplea el Sistema de Secreción Tipo VI (T6SS), que le permite competir con otras bacterias y modificar su interacción con el huésped [11].



**Figura 1.** Representación esquemática de los principales factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. Se ilustran componentes implicados en la formación de biofilm (a), *quorum sensing* (b), motilidad mediante flagelo (c), producción de sideróforos como pioverdina y piocianina (d), pili tipo IV (e), LPS (f), T3SS (g), T6SS (h) y T2SS (i) [12].

## Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (IP) en el genoma bacteriano son regiones que contienen una serie de genes que codifican factores de virulencia. En *Pseudomonas aeruginosa*, estas islas son fundamentales para su capacidad infecciosa, ya que otorgan a la bacteria una ventaja selectiva durante la infección [13].

Las IP son de tamaño variable (10-200 kb) y se caracterizan por tener una composición de bases diferente a la del resto del genoma bacteriano (generalmente mayor porcentaje en AT). Codifican genes para diversos factores de patogenicidad, como sistemas de secreción, toxinas, enzimas degradativas, adhesinas y factores de resistencia a la respuesta inmune [13].

Estas regiones pueden haber sido adquiridas a través de procesos de transferencia horizontal de genes, permitiendo integrarse en el cromosoma bacteriano y conferir ventajas adaptativas. Muchas IP contienen elementos genéticos móviles, como transposones o integrones, facilitando su movilidad dentro del genoma o su transferencia a otras bacterias [14].

Las IP se localizan en regiones específicas del genoma, generalmente cerca de genes de RNA de transferencia (RNAt), lo que permite su inserción y estabilidad dentro del DNA bacteriano. Asimismo, pueden presentar secuencias repetitivas o sitios de recombinación que facilitan su excisión y movilidad [15].

### **Transferencia horizontal**

Algunas de las IP presentes en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* pueden no haber sido heredadas por transferencia vertical de genes, sino que han podido ser adquiridas horizontalmente. Gracias a este proceso, la bacteria puede adquirir material génico externo que le proporciona ventajas evolutivas, como factores de virulencia y resistencia antimicrobiana. Por ello, las cepas clínicas pueden presentar diversidad genómica y por tanto diferente grado de virulencia [16].

Existen diversas vías por las que se puede dar este intercambio genético, como la conjugación, la transducción mediada por bacteriófagos y la transformación. Sin embargo, en este estudio se centrará en dos de estas vías: conjugación mediante plásmidos y transducción mediada por fagos. Ambas representan mecanismos de transferencia frecuentes y funcionalmente relevantes en *Pseudomonas aeruginosa*. Especialmente, esto sucede en entornos clínicos ya que contribuyen activamente a la diseminación de genes relacionados con la patogenicidad [17].

### **Importancia del estudio**

El estudio de los factores de virulencia en bacterias patógenas, como *Pseudomonas aeruginosa*, resulta fundamental para entender el desarrollo de enfermedades infecciosas. El análisis de estos permite mejorar el diagnóstico clínico e identificar los mecanismos clave de la patogénesis, ayudando a interpretar cómo una infección se establece, progresa y se manifiesta en el huésped.

Asimismo, conocer en detalle de los factores de virulencia ayuda a la predicción de la gravedad del cuadro clínico, siendo relevante en infecciones hospitalarias y en pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos. Desde una perspectiva terapéutica, estos estudios favorecen el diseño de tratamientos más específicos puesto que se pueden identificar blancos terapéuticos concretos y avanzar hacia el desarrollo de terapias dirigidas y vacunas.

Entender la distribución y dinámica de los factores de virulencia en distintas cepas es crucial para el control de brotes y para fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica, en la gestión de la salud pública.

## 2. Antecedentes, Hipótesis y Objetivos

### 2.1. Antecedentes

El departamento de Producción vegetal y Microbiología en colaboración con la ONG Cirugía en Turkana (CeT), participan en un Proyecto de Cooperación Internacional. Iniciado en 2004, este proyecto tiene como objetivo principal brindar asistencia quirúrgica a la población de Turkana, en el norte de Kenia. En el año 2022, se añadió una nueva línea centrada en el *Estudio de las resistencias antimicrobianas en Turkana (Kenia)* y financiado por la Fundación de Investigación del Hospital Clínico San Carlos (HCSC). Durante las campañas quirúrgicas de 2022-2024, se recogieron muestras de pacientes con infecciones y se obtuvieron aislamientos clínicos para el estudio de su resistoma. Los géneros bacterianos más frecuentemente identificados fueron *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

El trabajo que aquí se expone se centra en el estudio de la virulencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, examinando su expresión y base genética, y específicamente si estos factores se encuentran en islas de patogenicidad que pueden haber sido obtenidas por transferencia horizontal.

### 2.2. Hipótesis

El cuadro clínico producido en las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* depende de los factores de virulencia presentes en las islas de patogenicidad que pueden haber adquirido por transferencia horizontal.

### 2.3. Objetivos

#### Objetivo primario

Caracterizar los factores de virulencia presentes en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes en el condado de Turkana e identificar si estos se localizan en islas de patogenicidad susceptibles de transmisión horizontal.

#### Objetivos secundarios

- Construir mapas genómicos de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y determinar si los factores de virulencia se encuentran codificados en las islas de patogenicidad.
- Determinar los posibles elementos móviles presentes en el genoma que puedan ser susceptibles de transferir horizontalmente factores de patogenicidad.
- Determinar la expresión génica de los factores de patogenicidad, mediante el estudio del fenotipo de las cepas: producción de enzimas y sideróforos, formación de películas y motilidad.
- Determinar la relación existente entre la presencia de ciertos factores de virulencia y el cuadro clínico de la infección.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Consideraciones éticas

Este estudio ha recibido la aprobación de los comités de ética tanto del Hospital Clínico San Carlos como de la Universidad Miguel Hernández y ha obtenido el Código de Investigación Responsable (COIR) (Anexo 1). Además, cumple con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y respeta el Convenio sobre la Diversidad Biológica, según lo establecido en el protocolo de Nagoya.

#### 3.2. Selección de cepas

Para este estudio de factores de patogenicidad, se seleccionaron cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* basándose en dos criterios principales: que fueran aislados clínicos responsables de procesos infecciosos y que se dispusiera de la secuenciación completa de su genoma. Las cepas elegidas provienen de muestras clínicas obtenidas durante campañas quirúrgicas realizadas entre 2022 y 2024 en el Condado de Turkana, Kenia. Se disponía de la secuencia completa de su genoma en *contig* (del inglés contiguous sequence, secuencia contigua). Un *contig* es una secuencia de DNA que se ha ensamblado a partir de múltiples lecturas de secuenciación superpuestas (*reads*). Un *contig* indica una región del genoma donde el secuenciador ha podido generar lecturas que se superponen lo suficiente como para formar una secuencia ininterrumpida. Cada genoma estará constituido por un número específico de *contig* según se hayan podido solapar las secuencias. En la tabla x se especifica el número de *contig* que presentaba el genoma de cada cepa. Para más información sobre la secuenciación de alto rendimiento llevada a cabo para la obtención de los *contig* vease el anexo 1.

Para el presente trabajo, se han seleccionado cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: cepa 31, cepa 66, cepa L066 y cepa 10AM.

**Tabla 1.** Cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en el estudio, número de *contig* obtenidos al realizar la secuenciación de alto rendimiento y procedencia clínica de la cepa.

| Año  | Cepa | Contigs | Taxonomía basada en genoma completo | Patología de procedencia   | Hospital de procedencia de la muestra |
|------|------|---------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 2022 | 31   | 71      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | Fractura abierta tibia     | LCRH                                  |
| 2022 | 66   | 33      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | Herida en pierna izquierda | LCRH                                  |

|      |      |    |                               |               |        |
|------|------|----|-------------------------------|---------------|--------|
| 2023 | L066 | 82 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Osteomielitis | Kakuma |
| 2024 | 10AM | 33 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Pie diabético | LCRH   |

### 3.3. Ensamblaje del genoma completo

Para la construcción de los mapas genómicos, los *contig* fueron comparados con un genoma de referencia disponible en la base de datos del NCBI. Como secuencia de referencia, se seleccionó *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ampliamente caracterizada y empleada en estudios genómicos comparativos. La alineación y visualización de los genomas se llevó a cabo mediante el servidor web *Proksee*, empleando la herramienta *fastANI*, que permite estimar la posición y orientación de cada *contig* con respecto al genoma de referencia.

A los *contig* que presentaron discrepancias en la orientación se transformó su secuencia en inversa y complementaria, utilizando el servidor web *Reverse Complement* con el objetivo de optimizar la reconstrucción y representación del genoma completo.

Una vez los *contigs* estuvieron correctamente orientados respecto al genoma de referencia, se realizó la construcción del mapa circular completo permitiendo el análisis de distintas características genómicas relevantes, como el contenido de bases GC, la detección de genes codificantes (ORF), así como la identificación de regiones genómicas de interés: como islas de patogenicidad, secuencias fágicas y elementos genéticos móviles. El programa también realiza un BLAST con la base de datos CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) para la localización de genes de resistencia antimicrobianos en el genoma. Adicionalmente, se comparó el tamaño del genoma con el de referencia para detectar posibles adquisiciones genéticas específicas.

### 3.4. Búsqueda de plásmidos

La detección de posibles plásmidos presentes en las cepas analizadas se realizó mediante el entorno bioinformático Galaxy. Se utilizaron dos herramientas: *PlasmidFinder*, que permite identificar replicones plasmídicos conocidos mediante comparación con bases de datos de referencia, y *PlasFlow*, basada en algoritmos de aprendizaje automático donde se hace una predicción del origen plasmídico de secuencias a partir de su composición de bases. Con estas herramientas, se permite detectar *contigs* con potencial origen plasmídico, importante para el estudio de la transferencia horizontal de genes y la posible movilización de factores de virulencia.

### 3.5. Identificación de los factores de virulencia mediante BLAST

La identificación de factores de virulencia se llevó a cabo mediante BLASTp contra la base de datos VFDB (*Virulence Factor Database*), con un umbral de identidad del 60% y un e-value de  $10^{-5}$ .

### 3.6. Estudio fenotípico

El estudio fenotípico de las cepas seleccionadas de *Pseudomonas aeruginosa* se ha centrado en la caracterización de distintos factores de virulencia, mediante la aplicación de diferentes técnicas.

#### 3.6.1. Visualización de sideróforos, ROS y actividad lítica mediada por fagos

Para la evaluación fenotípica de la producción de sideróforos, especies reactivas de oxígenos (ROS) y actividad lítica mediada por fagos, se realizó una siembra directa de las cepas seleccionadas en medios de cultivo agar nutritivo (NA) y *Brain Heart Infusion* (BHI). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24-48 horas y se procedió a una inspección visual directa.

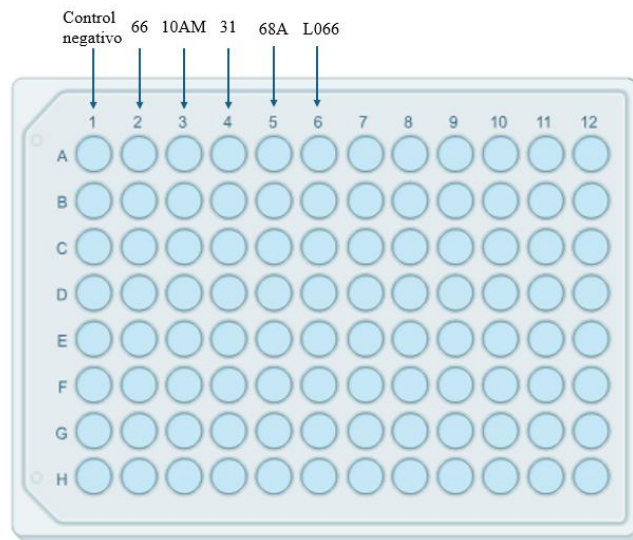
La evaluación se llevó a cabo mediante observación macroscópica de las placas, visualizando si había aparición de pigmentos característicos en las colonias, como la pioverdina, asociada a la captación de hierro, o la piocianina, relacionada con la producción de especies oxidantes.

Por último, la detección de actividad lítica mediada por fagos se llevó a cabo mediante la observación de halos de lisis en la superficie del cultivo.

#### 3.6.2. Ensayo presencia de biofilm

Para estudiar la presencia de biofilm se siguió el protocolo descrito por Stepanović et al. (2000) [18]. Para ello se inoculó *Pseudomonas aeruginosa* en 4 mL de caldo Brain Heart Infusión (BHI) suplementado con sacarosa al 2% en tubos SARSTEDT y se dejaron incubar a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, se midió la absorbancia de cada tubo a 600nm (D600) y se realizaron diluciones 1:10 de cada cepa con el objetivo de obtener una concentración final de 0,05 D600.

A continuación, se añadieron 100 µL en cada pocillo de la placa de 96 pocillos y se incluyó una columna control con solo medio de cultivo (Figura 2). La placa se incubó a 37°C durante 24 horas.



**Figura 2.** Esquema de distribución de muestras en la placa de microtitulación de 96 pocillos utilizada para el ensayo de formación de biofilm. Se analizaron cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y un control negativo.

Para evaluar la formación de biofilm, se realizó una tinción con cristal violeta siguiendo estos pasos:

1. Se retira el sobrenadante de cada pocillo (~80  $\mu$ L) con una pipeta con cuidado de no perturbar el pellet.
2. Se realiza un lavado con 200  $\mu$ L de PBS.
3. Se añaden 200  $\mu$ L de solución cristal violeta al 1% y se deja actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se realizan dos lavados adicionales con 200  $\mu$ L de PBS para eliminar el exceso de tinción.
5. Se deja secar a temperatura ambiente durante 24 horas o a 37°C durante 90 minutos.

Para cuantificar la formación de biofilm, se llevó a cabo la solubilización del cristal violeta y la posterior lectura de absorbancia:

1. Se añaden 200  $\mu$ L de isopropanol en cada pocillo para solubilizar el colorante.
2. Se deja actuar 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se mide la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Los valores obtenidos se analizaron comparándolos con el control negativo para determinar la capacidad de formación de biofilm de cada cepa.

### 3.6.3. Ensayo fenotípico para detección de plásmidos

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit comercial QIAprep 2.0 Spin Miniprep Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante. El procedimiento seguido es el siguiente:

1. Se centrifugaron entre 1 y 5 mL de cultivo bacteriano en medio líquido incubado durante la noche, a más de 8000 rpm ( $\approx 6800 \times g$ ) durante 3 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C), obteniéndose el pellet celular.
2. El pellet bacteriano se resuspendió en 250  $\mu$ L de tampón P1, y se transfirió a un tubo de microcentrífuga.
3. A continuación, se añadieron 250  $\mu$ L de tampón P2 y se mezcló cuidadosamente invirtiendo el tubo entre 4 y 6 veces, hasta obtener una solución homogénea y clara (usando LyseBlue, el color es azul). No se permitió que la lisis se prolongara más de 5 minutos.
4. Se añadieron 350  $\mu$ L de tampón N3, mezclando inmediatamente por inversión del tubo (4-6 veces). En presencia de LyseBlue, el color desaparece.
5. La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm ( $\approx 17.900 \times g$ ) durante 10 minutos en una microcentrífuga de sobremesa.
6. Se transfirieron 800  $\mu$ L del sobrenadante a una columna QIAprep 2.0. La solución se hizo pasar a través de la columna por centrifugación (30-60 segundos) o por vacío, eliminando el eluido.
7. En cepas endA<sup>+</sup> o con alta actividad nucleasa o contenido de carbohidratos, se realizó un lavado adicional con 0,5 mL de tampón. Tras centrifugar, se descartó el flujo.
8. Se llevó a cabo un lavado con 0,75 mL de tampón PE, centrifugando durante 30-60 segundos y eliminando el eluido.
9. Se centrifugó nuevamente durante 1 minuto para eliminar restos del tampón de lavado.
10. La columna se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio (1,5 mL), y se eluyó el DNA añadiendo 50  $\mu$ L de tampón EB (10 mM TrisCl, pH 8.5) o agua estéril, dejando reposar 1 minuto antes de centrifugar por 1 minuto adicional.
11. Si el DNA extraído se iba a analizar mediante electroforesis, se mezcló con tampón de carga (Loading Dye) en una proporción de 1:5 (carga:DNA), homogenizando la mezcla antes de cargarla en el gel.

Tras la extracción de DNA plasmídico, se procedió a la visualización de los posibles plásmidos presentes en las cepas analizadas. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 0,5% en tampón TBE y se realizó una electroforesis horizontal. Se mezclaron 5  $\mu$ L del DNA purificado con 1  $\mu$ L de colorante de carga (*Loading Dye*) y se cargaron en los pocillos del gel junto con un marcador de peso molecular específico para plásmidos. La electroforesis se llevó a cabo a 60V durante 1 hora. Finalmente, las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.

#### **3.6.4. Microscopía electrónica de barrido de Emisión de Campo (FESEM)**

Para observar la morfología superficial de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se llevó a cabo un protocolo de preparación de muestras para FESEM (del inglés *Field Emission Scanning Electron Microscope*) siguiendo los siguientes pasos:

1. Se resuspendió una colonia en 10 µL de suero fisiológico y se extendió cuidadosamente sobre un portaobjetos.
2. Se fijó con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,6) durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se lavó 3 veces con tampón cacodilato durante 10 minutos por cada lavado.
4. Se incubó con tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% en tampón cacodilato durante 40 minutos.
5. Se repitieron tres lavados con tampón cacodilato, también de 10 minutos cada uno.
6. Por último, la muestra fue deshidratada mediante una serie de baños en etanol a concentraciones crecientes: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% y 100% cada uno durante 10 minutos.
7. Las muestras deshidratadas se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche.

Las muestras fueron transportadas al servicio de Microscopía Electrónica del IDIBE (Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche), donde fueron recubiertas con una capa conductora de cromo de 16 nm utilizando el sistema Quorum Q150T Plus. Una vez recubiertas, se visualizan mediante FESEM, trabajando con voltajes entre 1,0 y 10 kV.

## 4. Resultados

### 4.1 Estudio de los factores de virulencia

#### 4.1.1. Análisis genotípico de los factores de virulencia

Mediante el análisis comparativo de las secuencias codificantes frente a la base de datos VFDB, se identificaron múltiples genes asociados a factores de virulencia en las cuatro cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* seleccionadas. En la Tabla 2 se resumen los principales factores de virulencia encontrados comparando las cuatro cepas con la de referencia, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Asimismo, en la última columna se indica si estos factores han sido evaluados posteriormente a nivel fenotípico.

**Tabla 2.** Comparativa de factores de virulencia (FV) genotípicos en las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* frente a la cepa de referencia PAO1.

| FV                           | 31                                                   | 66                                                   | L066                                                 | 10AM                                                 | PAO1                                                                                | Fenotipo estudiado |
|------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Adhesión</b>              | Pili tipo IV                                         | Pili tipo IV                                         | Pili tipo IV                                         | Pili tipo IV                                         | Pili tipo IV                                                                        | -                  |
| <b>Sistemas de secreción</b> | T2SS, T3SS, T6SS                                     | T2SS, T3SS, T6SS                                     | T2SS, T3SS                                           | T3SS, T6SS                                           | T2SS, T3SS, T6SS                                                                    | -                  |
| <b>Sideróforos</b>           | Pioverdina, piochelina                               | Pioverdina, piochelina                               | Pioverdina, piochelina                               | Pioverdina, piochelina                               | Pioverdina, piochelina                                                              | Sí                 |
| <b>ROS</b>                   | Piocianina (phz)                                     | Piocianina (phz), ácido cianhídrico (hcnABC)         | Piocianina (phz), ácido cianhídrico (hcnABC)         | Piocianina (phz), ácido cianhídrico (hcnABC)         | Piocianina (phz), ácido cianhídrico (hcnABC)                                        | Sí                 |
| <b>EPS</b>                   | Alginato                                             | Alginato                                             | Alginato                                             | Alginato                                             | Alginato, Pel, Psl                                                                  | Sí                 |
| <b>LPS</b>                   | Núcleo + O-antígeno                                  | Lípido A + O-antígeno                                | Lípido A + Núcleo                                    | Lípido A + Núcleo + O-antígeno                       | Lípido A + Núcleo + O-antígeno                                                      | -                  |
| <b>Quorum sensing</b>        | -Sistema Las (LasI/LasR)<br>-Sistema Rhl (RhII/RhIR) | -Sistema Las (LasI/LasR)<br>-Sistema Rhl (RhII/RhIR) | -Sistema Las (LasI/LasR)<br>-Sistema Rhl (RhII/RhIR) | -Sistema Las (LasI/LasR)<br>-Sistema Rhl (RhII/RhIR) | - Sistema Las (LasI/LasR)<br>- Sistema Rhl (RhII/RhIR)<br>- Sistema PQS (PqsA/PqsR) | -                  |
| <b>Flagelo</b>               | Sistema flagelar completo                            | Sistema flagelar completo                            | Sistema flagelar completo                            | Sistema flagelar completo                            | Sistema flagelar completo                                                           | -                  |

En cuanto a los sistemas de secreción detectados en las cepas: el tipo III (T3SS), implicado en la inyección de toxinas en células del huésped, está presente en todas las cepas. Sin embargo, el sistema tipo II (T2SS), relacionado con la secreción de enzimas extracelulares, no se detectó en la cepa 10AM. Además, el sistema de secreción tipo VI (T6SS), asociado a la competencia bacteriana y a la interacción con otras células, está ausente en la cepa L066.

Ninguna de las cepas mostró el sistema de secreción tipo IV (T4SS), imprescindible para la conjugación bacteriana.

Por otra parte, en la producción de sideróforos, todas las cepas presentaron genes para la pioverdina y piochelina. También, se identificaron genes implicados en la producción de piocianina, un pigmento con capacidad prooxidante, y del operón *hcnABC*, responsable de especies reactivas de oxígeno (ROS), que contribuye al potencial de virulencia de la bacteria.

Respecto a los exopolisacáridos (EPS), las cuatro cepas codifican genes para la síntesis de alginato. En cambio, la cepa PAO1 presenta también genes para *Pel* y *Psl*, ambos vinculados a la formación estructurada del biofilm.

En relación con el lipopolisacárido (LPS), se observaron diferencias en la composición, incluyendo la presencia o ausencia del O-antígeno, el núcleo y el lípido A.

Todas las cepas contienen los sistemas de *quorum sensing* *Las* y *Rhl*, y la cepa PAO1 también presenta el sistema *PQS*.

Los sistemas *Las* y *Rhl*, presentes en todas las cepas analizadas, actúan de forma coordinada mediante la producción de autoinductores tipo homoserina lactona, regulando genes implicados en la producción de elastasas, rhamnolípidos, piocianina y otros factores de virulencia. El sistema *Las* se sitúa jerárquicamente por encima del *Rhl* y lo activa en fases más tempranas del crecimiento. Por su parte, el

sistema *PQS*, detectado únicamente en la cepa PAO1, utiliza como molécula señal principal una molécula llamada *Pseudomonas quinolone signal*, también conocida como 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS). Esta molécula no se trata de una quinolona antibiótica sino de una quinolona endógena, sintetizada por la propia bacteria y perteneciente a la familia de las quinolonas. Se asocia con la regulación de genes implicados en la producción de metabolitos secundarios, como la piocianina, y en la formación de biofilm [19] [20].

Finalmente, todas las cepas conservan el sistema flagelar completo (movilidad en líquidos) y presentan los genes del pili tipo IV que confiere la posibilidad de moverse sobre superficies sólidas (*twitching motility*).

Los resultados obtenidos muestran la presencia de diversos genes de virulencia en todas las cepas analizadas, con algunas diferencias entre las cuatro cepas y la de referencia.

#### 4.1.2. Análisis fenotípico de los factores de virulencia

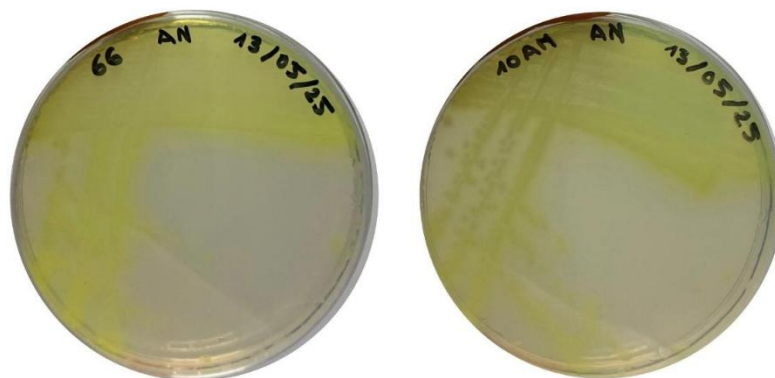
##### Sideróforos y ROS

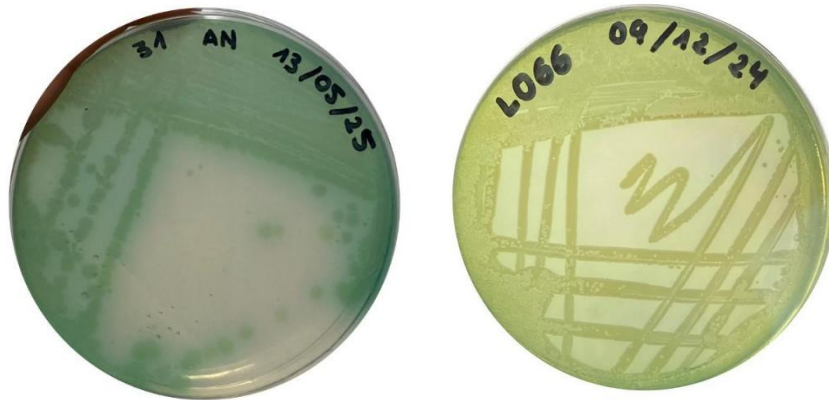
Se observó la presencia de pigmentos en las cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en medio agar nutritivo (NA) y BHI sólido.

La cepa L066 presentó un color fluorescente de color verde amarillento, característico de la producción de pioverdina, un sideróforo implicado en la captación de hierro en entornos con baja disponibilidad de este elemento.

La cepa 31 mostró una pigmentación de tono azulado, indicativa de la producción de piocianina, un pigmento con capacidad prooxidante vinculado a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Por último, las cepas 66 y 10 AM desarrollaron una coloración amarilla intensa, también compatible con la producción de pioverdina. Este pigmento, normalmente descrito como verde fluorescente, puede presentar una tonalidad amarilla en condiciones específicas (Figura 3).



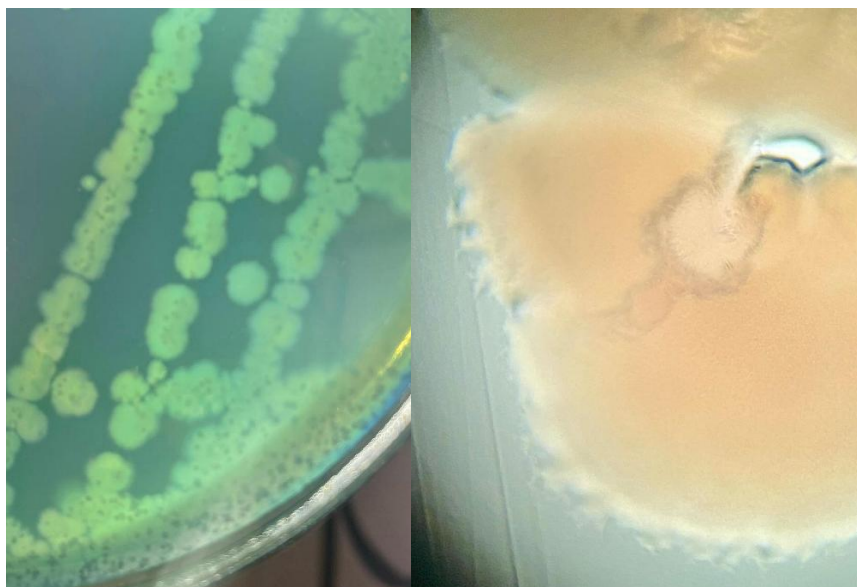


**Figura 3.** Cultivo en agar nutritivo de las cepas *P. aeruginosa* 31, 66, L066 y 10AM tras 24 horas de incubación a 37°C.

### Actividad lítica mediada por fagos

Además de los pigmentos, durante la observación fenotípica se evaluó la posible presencia de actividad lítica mediada por fagos. Se debe a la capacidad de ciertos bacteriófagos endógenos de inducir la lisis parcial de las colonias. Esta evaluación se llevó a cabo mediante la visualización macroscópica de las placas de cultivo, en las que se buscaron zonas de lisis o áreas calvas alrededor o dentro de las colonias bacterianas.

En la cepa 31 y L066 se apreciaron áreas translúcidas o correspondientes a zonas donde la bacteria han sido lisadas por acción de los fagos.



**Figura 4.** Formación de lisis en placas de cultivo correspondientes a las cepas L066 (izquierda) mediante visualización directa y 31 (derecha) mediante visualización al microscopio óptico a 40x.

## Formación de biofilm

Los resultados mostraron variabilidad en la capacidad de formación de biofilm entre las diferentes cepas. La cepa L066 presentó el valor más alto de absorbancia (Abs = 0,40), seguida de la cepa 10AM (Abs = 0,31), la cepa 66 (Abs = 0,19) y la cepa 31 (Abs = 0,18) (Tabla x).

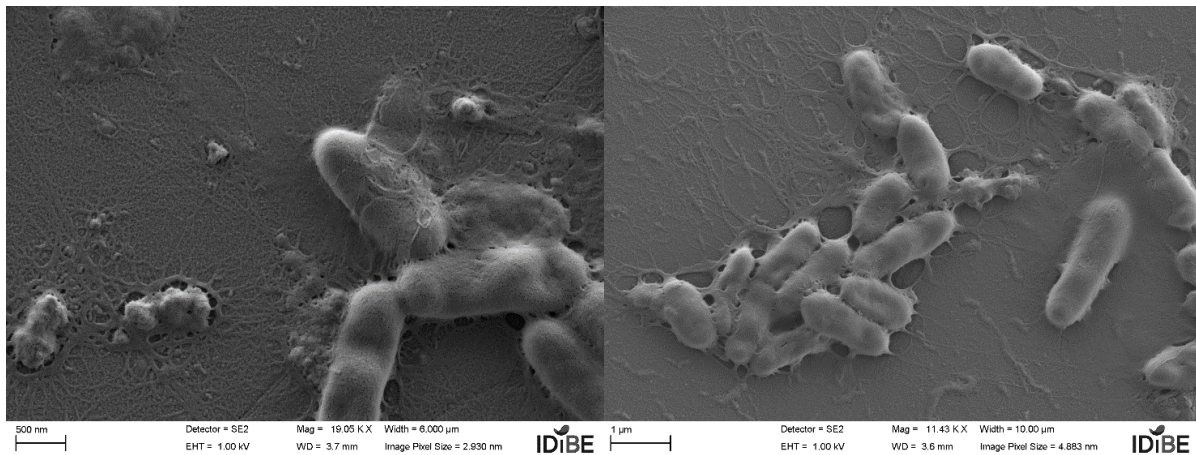
**Tabla 3.** Ensayo formación de biofilm en placa de 96 pocillos tras tinción con cristal violeta y cuantificación a 570 nm.

|             | Control | 31         | 66    | L066       | 10AM       |
|-------------|---------|------------|-------|------------|------------|
| A           | 0       | 0,092      | 0,091 | 0,181      | 0,188      |
| B           | 0       | 0,079      | 0,088 | 0,149      | 0,16       |
| C           | 0       | 0,064      | 0,093 | 0,214      | 0,127      |
| D           | 0       | 0,056      | 0,09  | 0,257      | 0,137      |
| E           | 0       | 0,128      | 0,091 | 0,244      | 0,131      |
| F           | 0       | 0,086      | 0,131 | 0,242      | 0,202      |
| G           | 0       | 0,138      | 0,095 | 0,115      | 0,145      |
| Media       | 0       | 0,09185714 | 0,097 | 0,20028571 | 0,15571429 |
| Abs pocillo | 0       | 0,18371429 | 0,194 | 0,40057143 | 0,31142857 |

Dado que el control negativo presentó valores constantes de absorbancia igual a cero, no se puede realizar el cálculo de un ODc según el criterio original de Stepanović et al. (2000) [18], se aplicó una clasificación, utilizada en numerosos estudios [21], donde las cepas se agruparon en categorías de capacidad débil (0,1-0,2), moderada (0,2-0,4) o fuerte (>0,4) según los valores de absorbancia obtenidos. La cepa L066 fue clasificada como formadora fuerte puesto que presenta un valor superior a 0,4; la cepa 10AM presentó un valor intermedio de absorbancia (entre 0,2-0,4), lo que corresponde a una formación moderada. Sin embargo, las cepas 31 y 66 se sitúan en el rango de formación débil, con valores de absorbancia bajo, por debajo de 0,2. Esta aproximación permite mantener la comparación entre cepas pese a la ausencia de variabilidad en el control.

## Observación EPS mediante FESEM

Se observan fibras y agregados alrededor de las células bacterianas, indicativos de la secreción de compuestos exopolisacáridos que contribuyen a la cohesión celular y a la formación de biofilm.

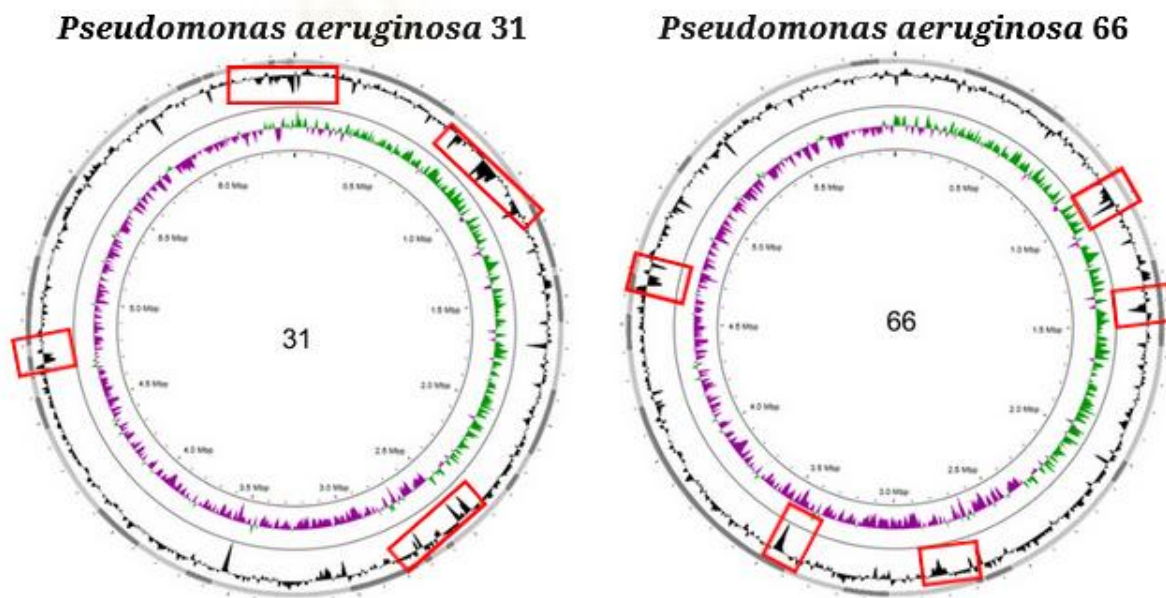


**Figura 5.** Observación de la cepa 10AM mediante microscopía electrónica de emisión de campo (FESEM), mostrando estructuras compatibles con matriz extracelular polimérica (EPS).

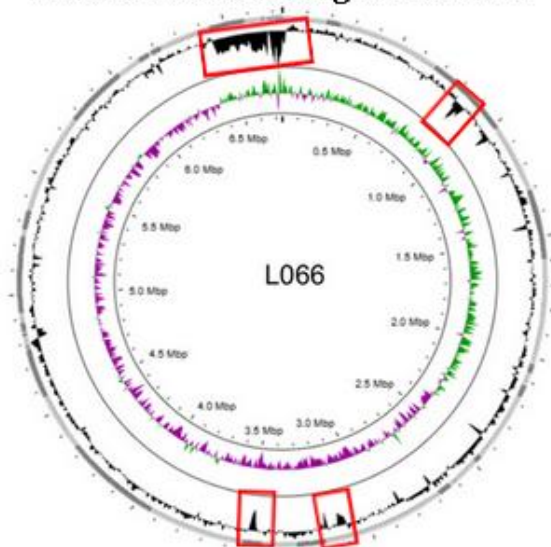
## 4.2. Estudio de la transferencia horizontal de genes

### 4.2.1. Islas de patogenicidad

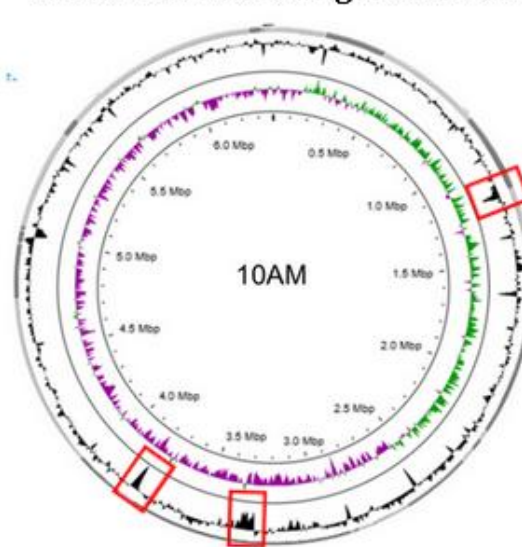
Una vez construidos los mapas genómicos circulares de las cuatro cepas por comparación con el genoma de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se pudieron observar regiones específicas con baja composición en GC, que podrían corresponder a islas de patogenicidad adquiridas por transferencia horizontal.



### *Pseudomonas aeruginosa* L066



### *Pseudomonas aeruginosa* 10AM



**Figura 6.** Mapa genómico circular de *Pseudomonas aeruginosa*. Del exterior hacia el interior, la línea de fuera corresponde con los *contigs* ordenados, la siguiente con el contenido en GC (las cajas rojas muestran las regiones con bajo contenido en GC), la línea con colores verde y violeta representan las regiones genómicas codificantes y su cadena de lectura; y por último, el tamaño en Mb.

El tamaño del genoma de las cepas varió entre 6,4 a 6.9 Mb (Tabla 4). Se identificaron *contigs* que no hibridaban con la cepa de referencia PAO1, que podría indicar regiones genómicas adquiridas, como islas de patogenicidad, fagos o elementos móviles. Estas regiones presentan, en muchos casos, un contenido GC divergente del promedio genómico.

La cepa L066 fue la que mostró un mayor número de *contigs* no homólogos (36 *contigs*), seguida de la cepa 31 (28 *contigs*) y la 10AM (2 *contigs*). EN cambio, la cepa 66 mostró una elevada homología con PAO1, sin *contigs* divergentes, lo que sugiere una menor adquisición reciente de material genético de forma horizontal.

La cepa de referencia PAO1 presenta un tamaño de 6,26 Mpb y un contenido en GC de 66.6% [22].

**Tabla 4.** Características del genoma generales de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

| Cepa | Tamaño genoma (Mb) | Número de contigs | % Contenido G+C | Contig no hibridan con la cepa de referencia PA01                                                                                                                                  |
|------|--------------------|-------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31   | 6,49               | 71                | 66.24           | C42, C45, C46, C47, C48, C49, C50, C51, C52, C53, C54, C55, C56, C57, C58, C59, C60, C61, C62, C63, C64, C65, C66, C67, C68, C69, C70, C71                                         |
| 66   | 6,23               | 33                | 66.54           | 0                                                                                                                                                                                  |
| L066 | 6,74               | 82                | 65.76           | C17, C24, C39, C48, C49, C51, C52, C53, C54, C56, C57, C58, C59, C60, C61, C62, C63, C64, C65, C66, C67, C68, C69, C70, C71, C72, C73, C74, C75, C76, C77, C78, C79, C80, C81, C82 |
| 10AM | 6,4                | 33                | 66.43           | C23, C33                                                                                                                                                                           |

#### 4.2.2. Plásmidos

El análisis de los plásmidos se abordó desde dos enfoques complementarios: uno genotípico, mediante herramientas bioinformáticas, y otro fenotípico, basado en la extracción y visualización directa del DNA plasmídico.

##### Análisis genotípico

El análisis informático predijo plásmidos en las cepas 31 y L066 (Tabla 5) mediante las dos herramientas empleadas, *PlasmidFinder* y *PlasFlow*.

**Tabla 5.** Resultados del análisis genómico de plásmidos mediante *PlasmidFinder* y *PlasFlow* integradas en la plataforma Galaxy.

| Cepa | PlasmidFinder | PlasFlow   |
|------|---------------|------------|
| 31   | -             | 12 contigs |
| 66   | -             | -          |
| L066 | C24           | 21 contigs |
| 10AM | -             | -          |

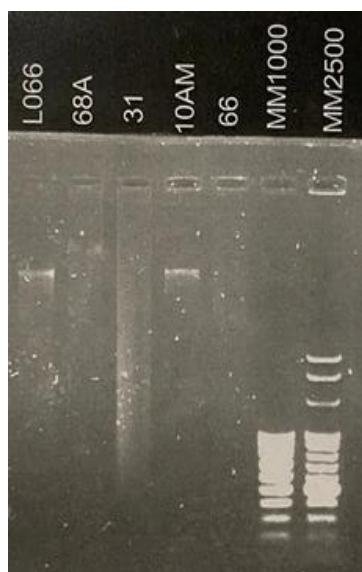
La herramienta *PlasmidFinder* únicamente detectó un replicón compatible con plásmido en la cepa L066, concretamente con el *contig* 24, lo que sugiere la presencia de un plásmido con alta similitud a los incluidos en la base de datos de referencia.

Por su parte, *Plasflow* predijo la existencia de 21 *contigs* de origen plasmídico en la misma cepa L066 y 12 *contigs* potenciales en la cepa 31, mientras que en las cepas 66 y 10 AM no se detectaron *contigs* con origen plasmídico según esta herramienta.

##### Análisis fenotípico

Desde un enfoque fenotípico, se realizó un ensayo de extracción de DNA plasmídico seguido de una electroforesis en gel de agarosa al 0,5%, con el objetivo de visualizar la presencia de posibles plásmidos. Esta técnica permite detectar bandas correspondientes a DNA plasmídico.

En los resultados obtenidos (Figura 7), se observaron bandas nítidas en las cepas L066 y 10AM. En cambio, las cepas 31 y 66 no mostraron bandas visibles en el gel.



**Figura 7.** Visualización en gel de agarosa al 0,5% de DNA plasmídico extraído de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4.2.3. Análisis de fagos

Con el objetivo de identificar posibles fagos presentes en los genomas de las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, se llevó a cabo un análisis bioinformático mediante la herramienta PHASTER. Los resultados obtenidos se compararon con la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, la cual presenta de forma conocida los fagos *Pf1* y *Pf4*, ambos filamentosos y lisogénicos.

**Tabla 6.** Fagos identificados en las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis con PHASTER. Se marcan en amarillo los fagos lisogénicos y en rosa los fagos líticos. El resto son temperados.

|                           | 31                               | 66 | L066     | 10AM                 | PAO1       |
|---------------------------|----------------------------------|----|----------|----------------------|------------|
| <b>Fago YMC11/02/R656</b> |                                  |    | R1_31331 | R1_31331<br>R2_58456 | Sí         |
| <b>Pf1</b>                |                                  |    | R4_7788  | R3_1284              | Pf4<br>Pf1 |
| <b>Phi 297 49135</b>      | R3_54096                         |    | R2-43237 |                      |            |
| <b>JBD69</b>              |                                  |    | R3_26408 |                      |            |
| <b>F10</b>                |                                  |    | R5_30409 |                      |            |
| <b>Stx2 II</b>            |                                  |    | R6_36852 |                      |            |
| <b>Dobby (37.152)</b>     | R1_17424<br>R2_47682<br>R4_29260 |    |          |                      |            |
| <b>phi HAP</b>            |                                  |    |          | R4_37764             |            |

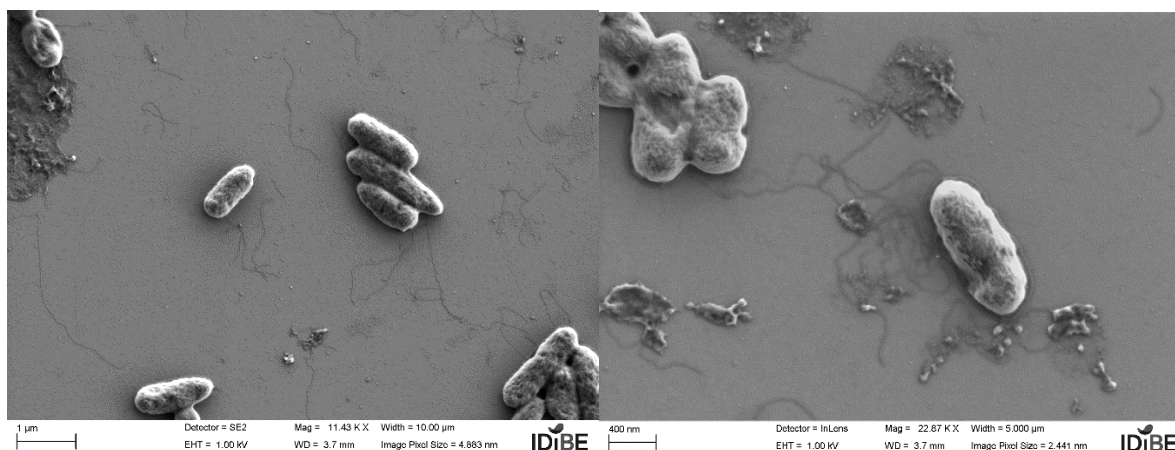
En la cepa 31, se identificó la presencia del fago *Phi 297* (R3\_54096) y del fago *Dobby* (R1\_17424, R2\_47682 y R4\_29260), lo que indica una posible diversidad fágica con implicación en la variabilidad genómica de la cepa. Ambos fagos son temperados. En cambio, la cepa 66 no presentó ningún fago detectable mediante PHASTER.

La cepa L066, se detectó el fago *Pf1* (R4\_7788) (en amarillo en la Tabla 6), así como otros fagos como *JBD69* (R3\_26408), *F10* (R5\_30409) y *Stx2 II* (R6\_36852), y el fago *YMC11/02/R656* (R1\_31331) este último es un fago lítico. Esta cepa presenta una carga fágica significativa. Los fagos *Pf1* son de morfología filamentosa y pudieron ser observados mediante FESEM como muestra en el apartado siguiente. Por lo tanto, esta cepa tiene fagos líticos, lisogénicos y temperados.

Por su parte, la cepa 10AM compartía con L066 la presencia del fago *Pf1* (R3\_1284), además del fago *YMC11/02/R656* (R1\_31331 y R2\_58456), y *phi HAP* (R4\_37764).

### Observación de fagos mediante FESEM

En la observación mediante FESEM de la cepa L066 (Figura 9) se identificaron estructuras filamentosas finas en el entorno extracelular, compatibles con la morfología típica de fagos filamentosos. La figura 9 muestra los fagos presentes en la cepa L066, compatible con los resultados genotípicos observados ya que presenta el fago *Pf1*.



**Figura 9.** Observación de fagos filamentosos mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) de la cepa L066. Estos fagos presentan un tamaño 2000 x 6 nm.

## 5. Discusión

El análisis genómico y fenotípico de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes del condado de Turkana ha permitido caracterizar un conjunto diverso de factores de virulencia que, en conjunto, refuerzan el potencial patogénico de estas cepas en contextos clínicos vulnerables. En comparación con la cepa de referencia PAO1, ampliamente estudiada en la literatura [22] [23], se han identificado tanto elementos conservados como variaciones genéticas que podrían estar relacionadas con la adaptación de estas cepas.

A nivel genotípico, todas las cepas analizadas presentaron genes asociados a adhesión, motilidad, sistemas de secreción y producción de sideróforos, lo que evidencia la conservación de funciones esenciales para el proceso de infección. Sin embargo, se observaron diferencias entre las cepas en la presencia de ciertos sistemas de secreción, en el caso del tipo II y tipo VI. La distribución de genes de exopolisacáridos implicados en la formación de biofilm fue igual entre todas las cepas clínicas, pero no presentaron los genes *Pel* y *Psl* que sí presenta la cepa de referencia.

La ausencia de los genes *Pel* y *Psl* puede ser compensada por otros mecanismos o rutas alternativas para formar biofilm, como el uso de alginato, proteínas adhesivas o fagos filamentosos, como en este caso. Estudios previos han demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* puede prescindir de *Pel* y *Psl* sin comprometer la capacidad de formar biofilm gracias a mecanismos redundantes que garantizan la cohesión y funcionalidad de la estructura multicelular [24].

La ausencia del sistema de secreción tipo VI en la cepa L066 puede deberse a que procede de un entorno con baja competencia microbiana, como heridas profundas o infecciones crónicas. En este caso, L066 procede de una osteomielitis que puede que no necesite mantener un sistema de ataque tan

costoso a nivel energético como es el T6SS [25]. Sin embargo, más de la mitad de los aislados de infecciones agudas o ambientales sí lo poseen [26].

En el caso de la ausencia del T2SS en la cepa 10AM, precedente de un pie diabético, tiene similitud con la ausencia del sistema de secreción tipo VI de la cepa 6. EL T2SS es responsable de la secreción de importantes factores de virulencia extracelulares como elastasa LasB, la exotoxina A o proteasas alcalinas, siendo esenciales en infecciones agudas [27]. Estudios previos han demostrado que cepas procedentes de infecciones persistentes, como úlceras crónicas, pueden presentar pérdida parcial o total del T2SS [28].

Desde un punto de vista fenotípico, la expresión de factores como la pioverdina, la piocianina o la capacidad de formación de biofilm mostró correlaciones relevantes con los perfiles genómicos observados. La cepa L066, que presentó la mayor capacidad de formación de biofilm junto con una elevada diversidad de fagos y *contigs* no homólogos con PAO1, sugiere la adquisición de material genético externo que podría estar modulando su virulencia. Asimismo, la cepa 10AM mostró una capacidad de biofilm intermedia y estructuras compatibles con EPS, apoyando la hipótesis de que ciertos elementos móviles como fagos podrían estar participando en la regulación de estas funciones.

Asimismo, el análisis mediante PHASTER reveló la presencia de múltiples fagos integrados en el genoma de las cepas 31, L066 y 10AM, mientras que la cepa 66 no presentó ningún fago detectable. La presencia de fagos filamentosos, como el fago *Pfl*, en L066 y 10AM, y la observación de morfología filamentosa en FESEM en estas cepas, sugieren un posible papel funcional de estos elementos en la persistencia y patogenicidad. De hecho, diversos estudios han demostrado que los fagos filamentosos no solo participan en la infección, sino que también actúan como componentes estructurales del biofilm, promoviendo su formación y estabilidad. Estas partículas se incorporan a la matriz extracelular, aumentando la cohesión del biofilm y contribuyendo a su resistencia frente a antimicrobianos y a la respuesta inmune del huésped [29]. Además, la capacidad de ciertos fagos para transportar genes relacionados con la virulencia o la resistencia a antibióticos mediante mecanismos de transducción refleja su influencia en la transferencia horizontal de genes [17]. En este estudio, se puede observar una correlación directa entre la presencia de fagos filamentosos y la formación de biofilm, puesto que las cepas L066 y 10AM, únicas portadoras de este tipo de fagos mostraron una mayor capacidad de formación de biofilm en el ensayo fenotípico.

La observación de zonas de lisis en placas de cultivo de las cepas L066 y 31 podría estar vinculada con la presencia de fagos funcionales y activos integrados en su genoma. Un fago que aparece en ambas cepas es el fago *phi297*. Aunque *phi297* es un fago temperado, se ha aislado un mutante virulento denominado *phi297vir*, capaz de lisar bacterias de *P.aeruginosa*, incluyendo cepas resistentes a fagos comerciales [30]. La posibilidad de utilizar mutantes virulentos no revertentes de fagos temperados como *phi297* se ha propuesto como una estrategia para el tratamiento de infecciones por

*P.aeruginosa*, especialmente en casos donde las cepas bacterianas muestran resistencia a múltiples antibióticos. En estas dos cepas (L066 y 31), el análisis bioinformático también presentó otros fagos, el fago *Dobby* en la cepa 31 y el fago *F10* en la cepa L066, que podrían mantenerse en estado profágico y reactivarse bajo condiciones específicas. El fago *Dobby*, clasificado como fago temperado tipo  $\phi$ CTX-like, ha sido descrito previamente como capaz de lisar cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones de laboratorio [31]. Por su parte, el fago *F10*, también de naturaleza temperada, ha sido identificado en diversos estudios como un elemento móvil con capacidad para movilizar DNA bacteriano y con potencial lítico [32], aunque su papel específico en la inducción espontánea del ciclo lítico no ha sido descrito en detalle. En ambos casos, su detección en *contigs* casi completos y su clasificación como fagos temperados refuerza la hipótesis de que sean funcionales en nuestras cepas y capaces de inducir el ciclo lítico bajo determinadas condiciones.

En la cepa 10AM, aunque también se identificó, mediante análisis bioinformático, el fago lítico *YMC11/02/R656*, aunque en esta cepa no se evidenció actividad lítica visible en cultivo en las placas. Esta discrepancia podría deberse a interacciones entre los fagos dentro de la propia célula, las condiciones del cultivo no fueran las apropiadas para inducir la lisis, o fuese capaz de integrarse en el genoma y ser atemperado. Un estudio de secuenciación de fagos obtenidos de los sobrenadantes de los cultivos podría aclarar qué fago es el que está produciendo la lisis en cada una de las cepas. Finalmente, la cepa 66, que no mostró fagos detectables ni zonas de lisis en cultivo, respalda la relación entre la presencia de fagos estructuralmente completos y la capacidad de inducir lisis bacteriana.

En cuanto a los plásmidos, los resultados muestran una concordancia entre el análisis genotípico y fenotípico para la cepa L066, que fue la única cepa que se detectó un replicón plasmídico tanto por análisis bioinformático como por la visualización en gel mediante electroforesis. Esto podría indicar una mayor movilidad genética en esta cepa, teniendo en cuenta su complejidad genómica y su elevada capacidad de formar biofilm. La ausencia de plásmidos visibles en las cepas 31 y 66 no excluye completamente su presencia, ya que pueden encontrarse en cantidades bajas o integrados en el genoma. En el caso de la cepa 10AM, se detectaron bandas compatibles con plásmidos mediante electroforesis, sin embargo, no se identificaron *contigs* de origen plasmídico mediante las herramientas bioinformáticas utilizadas. Esta discrepancia puede deberse a limitaciones del ensamble genómico, baja similitud de los plásmidos con las bases de datos de referencia, o a que se trate de plásmidos no reconocidos por los algoritmos utilizados.

Por otro lado, cabe destacar que ninguna de las cepas analizadas presentó genes correspondientes al sistema de secreción tipo IV (T4SS), lo cual resulta relevante, ya que este sistema es necesario para llevar a cabo procesos de conjugación bacteriana, uno de los principales mecanismos de transferencia horizontal de plásmidos y otros elementos genéticos móviles. La ausencia de T4SS en estas cepas sugiere que, al menos bajo condiciones analizadas, la transferencia conjugativa no

constituiría una vía activa de diseminación genética, lo que podría limitar parcialmente la movilidad de plásmidos entre bacterias.

Además, al considerar la procedencia clínica de los aislamientos, se observa una posible relación entre el tipo de infección y los perfiles genotípicos y fenotípicos observados. Las cepas aisladas de infecciones profundas y crónicas, como L066 (osteomielitis) y 10AM (pie diabético), mostraron una mayor capacidad de formación de biofilm y la presencia de fagos filamentosos. En cambio, las cepas 31 y 66, obtenidas de heridas superficiales, presentaron un perfil más limitado en cuanto a elementos asociados a la persistencia, lo que podría reflejar un comportamiento más agudo y menos dependiente de colonización prolongada.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio permiten ampliar el conocimiento sobre los factores de virulencia y los elementos genético móviles presentes en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en un entorno sanitario vulnerable como el condado de Turkana. La combinación de análisis genómicos y fenotípicos ha permitido identificar elementos clave como los fagos filamentosos, cuya implicación en la formación de biofilm no solo ayuda en su papel en la persistencia bacteriana, sino también plantea nuevas oportunidades en el desarrollo de estrategias terapéuticas. Comprender la participación de estos fagos en la arquitectura del biofilm puede resultar especialmente útil para diseñar intervenciones dirigidas a debilitar su estructura, aumentando así la eficacia de los tratamientos antimicrobianos en infecciones crónicas. Por otra parte, el estudio de los fagos líticos y temperados identificados en esta investigación podría contribuir al desarrollo de herramientas terapéuticas basadas en fagoterapia para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

Asimismo, la integración de datos genotípicos y fenotípicos contribuye a ampliar el conocimiento sobre cepas locales y puede servir como base para estrategias de vigilancia epidemiológica, desarrollo de biomarcadores de virulencia o diseño de herramientas terapéuticas más eficaces y adaptadas a escenarios sanitarios con recursos limitados.

## 6. Conclusiones

- La caracterización genómica y fenotípica de cuatro cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes del condado de Turkana (Kenia), ha permitido identificar factores de virulencia y variabilidad genética en un contexto clínico concreto.
- La cepa que presentó mayor variabilidad genética frente a la cepa de referencia PAO1, fue la cepa L066, con el mayor genoma (6.7 Mb) y el contenido más bajo en GC (65,76%). Esta cepa presentó una región con bajo contenido en GCs donde se localizaron fagos y plásmidos.
- La cepa L066, mostró mediante el estudio genotípico y fenotípico, la existencia de un plásmido con bajo contenido en GC.

- A nivel genotípico, todas las cepas presentan genes relacionados con adhesión, motilidad, sistemas de secreción y producción de sideróforos, ROS y EPS, aunque se observó ausencia de genes *Pel* y *Psl* implicados en la estructuración de biofilm.
- Los ensayos fenotípicos confirman la producción de sideróforos, pigmentos y biofilm, mostrando una correlación con los perfiles genéticos.
- En las cepas L066 y 10AM, donde se observó elevada capacidad de formación de biofilm, se detectaron fagos filamentosos (*Pfl*) que se postulan como elementos relevantes en la estructura del biofilm favoreciendo la persistencia bacteriana.
- El análisis bioinformático de fagos mostró la presencia de múltiples fagos en las cepas 31, L066 y 10AM, incluyendo fagos líticos, lisogénicos y temperados.
- La observación de zonas de lisis en las cepas L066 y 31 podría estar asociada a la activación espontánea del ciclo lítico por fagos funcionales.
- La presencia de plásmidos y fagos indican la posible adquisición de mecanismos de patogenicidad mediante transferencia horizontal, si bien la ausencia del T4SS impide la conjugación de estas cepas para poder transmitir estos factores a otras cepas, siendo posible la transmisión por transducción.

## 7. Proyecciones futuras

En este estudio se han identificado fagos estructuralmente completos en algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, y en los ensayos fenotípicos se ha podido observar actividad lítica espontánea. Por tanto, sería de gran interés explorar el potencial terapéutico de estos fagos. Podrían evaluarse como herramientas alternativas para el control de infecciones por *P. aeruginosa* multirresistente, especialmente en áreas donde los tratamientos convencionales han perdido eficacia.

## 8. Bibliografía:

1. Bel Hadj Ahmed A, Salah Abbassi M, Rojo-Bezares B, Ruiz-Roldán L, Dhahri R, Mehri I, Sáenz Y, Hassen A. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various environmental niches: New STs and occurrence of antibiotic susceptible "high-risk clones". Int J Environ Health Res. 2020 Dec;30(6):643-652. doi: 10.1080/09603123.2019.1616080. Epub 2019 May 16. PMID: 31094221. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31094221/>
2. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8003266/>
3. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Feb 15;7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039. PMID: 28261568; PMCID: PMC5310132. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5310132/>
4. Nadal Jimenez PKoch GThompson JA, Xavier KBCool RH, Quax WJ.2012.The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev76: <https://doi.org/10.1128/mmlbr.05007-11>
5. Benson DE, Burns GL, Mohammad SF. Effects of plasma on adhesion of biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to fibrin substrate. ASAIO J. 1996 Sep-Oct;42(5):M655-60. doi: 10.1097/00002480-199609000-00069. PMID: 8944962. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8944962/>
6. Mateu-Borrás M, Zamorano L, González-Alsina A, Sánchez-Diener I, Doménech-Sánchez A, Oliver A and Albertí S (2022) Molecular Analysis of the Contribution of Alkaline Protease A and Elastase B to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:816356. doi: 10.3389/fcimb.2021.816356 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.816356>
7. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7, 199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

8. Managò A, Becker KA, Carpinteiro A, Wilker B, Soddemann M, Seitz AP, Edwards MJ, Grassmé H, Szabò I, Gulbins E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin induces neutrophil death via mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial acid sphingomyelinase. *Antioxid Redox Signal*. 2015 May 1;22(13):1097-110. doi: 10.1089/ars.2014.5979. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25686490; PMCID: PMC4403017. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5979>
9. Ghssein G, Ezzeddine Z. A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology (Basel)*. 2022 Nov 25;11(12):1711. doi: 10.3390/biology11121711. PMID: 36552220; PMCID: PMC9774294. <https://doi.org/10.3390/biology11121711>
10. Nolasco-Romero CG, Prado-Galbarro FJ, Jimenez-Juarez RN, Gomez-Ramirez U, Cancino-Díaz JC, López-Marceliano B, Apodaca MR, Aguayo-Romero MA, Rodea GE, Pichardo-Villalon L, Parra-Ortega I, Santos FS, Moreno-Galván M, Velázquez-Guadarrama N. The *exoS*, *exoT*, *exoU* and *exoY* Virulotypes of the Type 3 Secretion System in Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* as a Death Risk Factor in Pediatric Patients. *Pathogens*. 2024 Nov 22;13(12):1030. doi: 10.3390/pathogens13121030. PMID: 39770290; PMCID: PMC11677868. <https://doi.org/10.3390/pathogens13121030>
11. Rudzite M, Subramoni S, Endres RG, Filloux A. Effectiveness of *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system relies on toxin potency and type IV pili-dependent interaction. *PLoS Pathog*. 2023 May 30;19(5):e1011428. doi: 10.1371/journal.ppat.1011428. PMID: 37253075; PMCID: PMC10281587. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011428>
12. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
13. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 Dec;74(4):621-41. doi: 10.1128/MMBR.00027-10. PMID: 21119020; PMCID: PMC3008168. <https://doi.org/10.1128/mmb.00027-10>
14. Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. *et al.* Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414–424 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>

15. Schmidt H, Hensel M 2004. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: <https://doi.org/10.1128/cmr.17.1.14-56.2004>
16. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:641-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.641. PMID: 11018140. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.641>
17. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Sep;3(9):722-32. doi: 10.1038/nrmicro1235. PMID: 16138100. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000 Apr;40(2):175-9. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6. PMID: 10699673. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
19. Nadal Jimenez PKoch GThompson JA, Xavier KBCool RH, Quax WJ. 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: <https://doi.org/10.1128/mnbr.05007-11>
20. Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., ... & Rahme, L. G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04448.x>
21. Hashem, Y.A., Amin, H.M., Essam, T.M. *et al.* Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Sci Rep* 7, 5733 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05901-0>
22. Stover, C., Pham, X., Erwin, A. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964 (2000). <https://doi.org/10.1038/35023079>
23. Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G. *et al.* Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90 (2006). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>

24. Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C., & Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1913–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
25. Ho, B. T., Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. (2014). A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host & Microbe*, 15(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.008>
26. Subedi, D., Vijay, A.K., Kohli, G.S. *et al.* Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci Rep* **8**, 15668 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
27. Jasmine Lee, Lianhui Zhang, The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, *Protein & Cell*, Volume 6, Issue 1, January 2015, Pages 26–41, <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
28. Marvig, R., Sommer, L., Molin, S. *et al.* Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* **47**, 57–64 (2015). <https://doi.org/10.1038/ng.3148>
29. Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS, Kjelleberg S. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J*. 2009 Mar;3(3):271-82. doi: 10.1038/ismej.2008.109. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19005496; PMCID: PMC2648530. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.109>
30. Burkal'tseva MV, Krylov SV, Kropinskiĭ AM, Pletneva EA, Shaburova OV, Krylov VN. [Bacteriophage phi297--the new species of temperate phages *Pseudomonas aeruginosa* with a mosaic genome: potential use in phagotherapy]. *Genetika*. 2011 Jul;47(7):900-4. Russian. PMID: 21938953. <http://dx.doi.org/10.1134/S102279541106007X>
31. Johnson G, Wolfe AJ, Putonti C. Characterization of the  $\phi$ CTX-like *Pseudomonas aeruginosa* phage Dobby isolated from the kidney stone microbiota. *Access Microbiol*. 2019;1(1):e000002. doi: 10.1099/acmi.0.000002. Epub 2019 Mar 20. PMID: 32864566; PMCID: PMC7454045. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000002>

32. Sepúlveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Jun;78(12):4510-5. doi: 10.1128/AEM.00065-12. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22504803; PMCID: PMC3370533. <https://doi.org/10.1128/AEM.00065-12>

