



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Bacteriófagos y movilización de genes de resistencia a antibióticos desde una perspectiva One-Health

Pedro Blanco Picazo

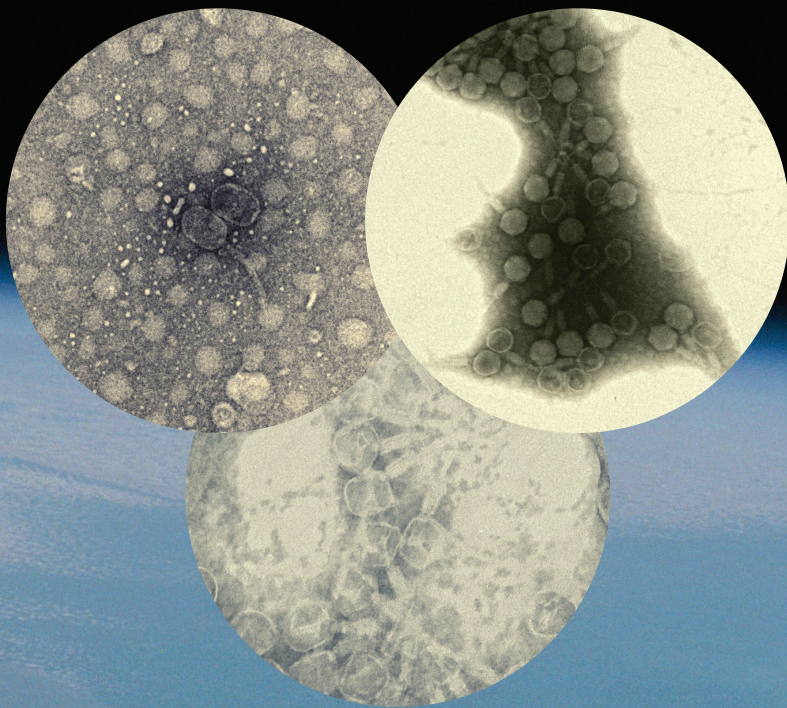


Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Bacteriófagos y movilización de genes
de resistencia a antibióticos desde una
perspectiva One-Health



Pedro Blanco Picazo

Septiembre 2022



UNIVERSITAT_{DE} BARCELONA

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística
Facultad de Biología

Bacteriófagos y movilización de genes de resistencia a antibióticos desde una perspectiva *One-Health*

Memoria presentada por PEDRO BLANCO PICAZO para optar por el título de
Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado EEES: Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. M^a Teresa Muniesa Pérez y la Dra.
Lorena Rodríguez Rubio en el Departamento de Genética, Microbiología y
Estadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona

La directora y tutora,

La directora,

M^a Teresa Muniesa Pérez

Lorena Rodríguez Rubio

El doctorando,

Pedro Blanco Picazo

Barcelona, septiembre de 2022

Todos los caminos llevan a Roma

AGRADECIMIENTOS

Por fin llegó el momento de escribir el único apartado de esta tesis que todo el mundo quiere y va a leer. Han pasado ya 4 años desde que inicié esta nueva etapa en mi vida, 4 años en los que ha pasado de todo, empezando por una pandemia que nos dejó a todos descolocados, una guerra con muy poco sentido y ¡hasta la erupción de un volcán! Pobre tocayo Sánchez la que te ha tocado... Es de locos, sí, pero todo ello nos ha servido para darnos cuenta de que hay que aprovechar el tiempo y disfrutar de cada momento, y también de lo más importante de la vida, ¡vivirla! No todo es negativo, y estos años también he disfrutado y he aprendido muchísimo, tanto a nivel profesional como personal, y gran parte de ello se lo debo a todas las personas a las que dedico estas páginas, empezando por las protagonistas, las que han hecho posible que hoy esté aquí escribiendo estas palabras, mis dos jefas.

Maite, sin apenas conocerme me abriste las puertas al mundo de la investigación y depositaste tu confianza en mí para afrontar el reto que es llevar a cabo una tesis doctoral. Has sido mi guía a lo largo de estos años, orientándome y dándome los mejores consejos, proporcionándome tu ayuda siempre que la he necesitado. Muchas gracias por tu pasión, eficiencia e ilusión en la búsqueda de conocimiento y de nuevos descubrimientos en el inmenso mundo de los bacteriófagos, que han conseguido “propagar” en mí y me han dado las ganas de continuar descubriendo este microscópico mundo y de transmitir todos los conocimientos que he adquirido a lo largo de estos años. Gracias también por tu alegría cuando salían los resultados, por tu positividad cuando algo no salía como esperábamos, que me animaba a continuar y dar lo mejor de mí, por tu comprensión y tu paciencia (que seguro también has tenido), por apostar por mí y confiar en que era capaz de hacerlo, incluso cuando he estado más perdido, y, en definitiva, por ser una grandísima líder.

Lorena, guía y compañera. Desde el principio has estado conmigo enseñándome la dinámica del laboratorio, las técnicas y protocolos, que eran nuevos para mí, y lo sagrado que es la pausa del café. Muchas gracias por la perseverancia en que razonara en cómo y por qué se hacen las cosas, por conocerme mejor y saber que necesitaba en cada momento, por tu apoyo y comprensión siempre que he necesitado tu ayuda, por las charlas sobre el futuro, por los millones de consejos que me has dado a lo largo de estos años y por transmitirme toda tu experiencia y los innumerables conocimientos que tienes. Para mí ya has sido una gran líder, y estoy seguro de que en el futuro lo serás aún más, porque te quedan muchos doctorandos y alumnos que estarán encantados de aprender de toda una experta en microbiología.

También quiero agradecer al resto de jefes del grupo MARS, a **Anicet** por su profesionalidad y las pequeñas charlas sobre sus vivencias personales, a **Cristina** por su cercanía, amabilidad, y por estar siempre dispuesta a ayudar, y también a **Francisco** y a **Joan**, que,

aunque he coincidido poco con vosotros, siempre habéis enriquecido el ambiente con vuestras anécdotas y vivencias. Agradecer a **Eli** su ayuda, profesionalidad e implicación, y por elegir siempre el laboratorio 10 para filtrar, que nos ha refrescado el ambiente de verano.

Llegó el momento de agradecer a todos los compañeros y compañeras con los que he tenido el placer, no sólo de trabajar, sino también de compartir experiencias y vivencias que han conseguido que estos años sean algo más que un trabajo.

Aiora, el pilar principal del laboratorio 10. Cuando llegué me integraste rápido en el grupo y desde el principio he sabido que nos íbamos a llevar muy bien. Gracias por todas las risas y las miles de anécdotas que me llevo, por estar siempre disponible para cualquiera de mis dudas (por insignificantes que fueran), por todas las charlas, y por ayudarme y defenderme siempre que lo he necesitado. Eres toda una amiga, en la que se puede confiar, y sin ti el laboratorio 10 no sería lo mismo. Estos años hemos compartido momentos muy frustrantes y siempre nos unirá que fuimos de las pocas parejas que conseguimos casarnos en plena pandemia. Ahora estás hecha toda una madraza y te espera una de las mayores aventuras de la vida.

Dani, compañero, confidente, amigo. Qué curioso el destino que nos volvió a unir como compañeros. Sinceramente, me dio una alegría tremenda cuando nos volvimos a encontrar el día que Maite me presentó a todo el laboratorio. Realizar la tesis juntos ha hecho que nos unamos mucho más y forjemos una grandísima amistad. Gracias por las largas charlas (algunas serias y otras no tanto), por los momentos de desconexión y por las risas que nos hemos echado, por dejarme poner canciones absurdas, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de los juegos de mesa y enseñarme nuevos idiomas. Has sido mi burbuja y unidad familiar, y hemos compartido muchísimas experiencias juntos; congresos, comidas, cenas, escape rooms. Está claro que sin ti estos 4 años no hubieran sido lo mismo.

Uno de los grandes compañeros y amigos con el que he tenido el auténtico placer de trabajar es **Pablo**. Simpático, positivo, dicharachero, con don de gentes, futbolero, animador, son sólo algunas palabras que te definen, pero me quedo con compañero y amigo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por transmitirme toda tu experiencia y ayuda en cada momento que te he necesitado (que han sido muchas ocasiones), por estar siempre disponible, y sobre todo gracias por tu apoyo y motivación y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, dentro y fuera del trabajo, y que espero que podamos seguir viviendo juntos. A tus 28 años has conseguido grandes cosas en la vida y todavía te quedan grandes momentos por descubrir.

Agradecer ahora a una de las personas con las que coincidí nada más entrar al departamento y que regresó para realizar la tesis. **Clara**, gracias por tu alegría y amistad, por todas las risas

que nos han hecho desconectar cuando lo necesitábamos y por compartir tan buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por dejarme ser tu *sensei*, aunque en muchas ocasiones la *sensei* hayas sido tú. En este tiempo que hemos coincidido he descubierto que eres una grandísima persona y una gran amiga.

Llegó el turno de agradecer a todas las compañeras del laboratorio 9, nuestro laboratorio hermano. **Raquel**, la que más se hace notar de todo el departamento. Eres una grandísima profesional y quería agradecerte por toda la ayuda y consejos que me has dado estos años. Sin tu energía y diversión a nuestros laboratorios le faltaría esa pieza clave que consigue sacarte una sonrisa y alegrarte el día. **Julia**, en estos años he aprendido mucho de ti al compartir contigo las clases de prácticas, y me has transmitido toda tu profesionalidad y experiencia. Se nota que eres una gran profesora. De todos los compañeros de prácticas, tu has sido la que más me ha enseñado y la que más me ha inspirado. Gracias por todas las charlas sobre buceo y por todas las experiencias (tardes de juegos de mesa, las comidas, escape rooms) que hemos compartido. **Miriam**, compartimos una de las mejores aficiones que se puede tener, que es viajar. Muchas gracias por tu profesionalidad y cercanía, proporcionándome tu ayuda cuando la he necesitado, por todas las charlas sobre futuros destinos a los que me gustaría ir y por las recomendaciones de nuevos escapes rooms y de restaurantes. También quería agradecer a la última persona en llegar al equipo *Bluephage*, **Ari**. Te has integrado super rápido y te has unido al mejor club que había, el de las series y pelis, hasta el punto de engancharte y querer ver más. Gracias por tu compañía y cercanía.

También quería agradecer a **Anna**, compañera de tesis en la distancia, por sus ánimos para terminar con fuerza la tesis. ¡Ya la tienes! Ahora queda el último empujón y ya está. Gracias por todas las charlas y por la cercanía que me has dado, y por tu ayuda con el escape room donde realicé la pedida de mano. Es algo que nunca olvidaré. **Paula**, casi doctora, mucho ánimo que ya eres la siguiente. Eres toda una profesional y se nota que te gusta mucho tu trabajo. Gracias por todas las charlas, por tu implicación en el laboratorio y por unirse siempre a todas las comidas y partidas de juegos.

También agradecer a las nuevas incorporaciones: **Geno**, que ha vuelto recientemente, y se nota por la estela de buen rollo que estás dejando en el laboratorio 10. Espero que puedas estar mucho tiempo con nosotros. **Sara**, gracias por tu alegría y diversión, por enseñarnos la auténtica jerga colombiana y por esa energía que transmites. Seguro que te irá genial con la tesis. **Laura**, gracias por tu simpatía y por darme nuevos nombres y apellidos que han conseguido que el ambiente de trabajo sea mucho más divertido y **Loles**, que, aunque hemos coincidido poquito, se nota el encanto y la positividad que transmites al grupo.

Agradecer al resto de compañeros que han pasado por el laboratorio y con los que he coincidido estos años: **Sergio, Gabi, Gustavo, Irene, Sara, Adán**; y especialmente agradecer a **Maryury**, que me transmitió todos sus conocimientos al inicio de la tesis, y a **Judith y Robert** (uno más de los nuestros) por todas las charlas (aunque muchas veces no entendiera muy bien de que hablabais), por vuestra convicción y vuestros valores, que son dignos de admirar y os harán llegar muy lejos. Disculpad si me he dejado a algún compañero, pero me hago mayor y la memoria empieza a fallar.

No podían faltar en estos agradecimientos los miembros de la secretaría, por su enorme buen rollo, aunque nos obliguéis a disfrazarnos en carnaval a cambio de un buñuelo. En especial agradecer a **Susana, Bea y Rosario** por su ayuda y por las buenas charlas que hemos tenido en la secretaría, y también a **Manolo**, al que he martirizado un poco con tantos tiques, pero ya se acabó, ya no hay más tiques, lo prometo.

También agradecer al resto de compañeros de otros laboratorios, tanto de fase 1 como de fase 2, todos unidos por el objetivo de terminar la tesis doctoral. En especial agradecer a los compañeros y compañeras de fase **Sandra, Eva, Marta**, siempre dispuestas a ayudar y a echar un cable en todo lo que necesitara, a **Ayalke**, el hombre que siempre aparece cuando menos lo esperas, gracias por tu simpatía y tu compañerismo durante todos estos años, y a **Maite y Elena** por ese humor tan característico con el que tan bien me lo he pasado.

También quería agradecer a **Marta Cerdà**, por confiar en mí y proponerme para realizar un doctorado al ponerme en contacto con Maite, porque sin su recomendación probablemente no estaría hoy aquí escribiendo estas páginas. Agradecer también a **Tere** y a todo el equipo del CReSA, cuya cercanía e implicación me motivó a continuar en el ámbito de la microbiología.

Trabajar con vosotr@s ha hecho que sea una persona mucho más capaz y segura de sí mismo, habéis conseguido que confiara más en mí, y eso es algo que siempre llevaré conmigo.

Fuera del ámbito laboral, también quería agradecer a mi familia por darme alas y la libertad e independencia suficiente para poder elegir mi camino, aunque me haya equivocado en muchas ocasiones, siempre habéis estado ahí y sé que siempre estaréis. Gracias a mis padres, **Isabel y Celes**, por proporcionarme todo en la vida, por su apoyo incondicional y por darme todos los ánimos y la energía para seguir adelante y conseguir todo lo que me proponga. A mi hermana **Isabel**, por su convicción y alegría cuando más la he necesitado y por darme una de las experiencias más bonitas que puedes tener en la vida, ser tío del pequeño **Miguelín**, que tiene todo su futuro por delante.

Tampoco podían faltar en estos agradecimientos los mejores amigos que me han acompañado durante todos estos años. Principalmente agradecer a mis loteres, **Lucía y Fran** (y ahora también a Mia) por hacerme disfrutar de cada momento juntos, sois nuestra familia en Barcelona y sin vosotros la vida no sería lo mismo.

Finalmente, como se suele decir, se deja uno lo mejor para el final, ese postre que todos estamos deseando que llegue, y en este caso no podía faltar **Nadia**, mi pilar, mi compañera de viaje y de aventuras, mi mujer y mi familia, y ahora también la madre de nuestro hij@. No hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, todo lo que me has dado y todo lo que me darás. Como siempre dices, *la vida es una aventura*, y esa aventura la quiero vivir contigo.

RESUMEN

En las últimas décadas la resistencia a antibióticos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel global, y desde la iniciativa *One-Health* se han propuesto afrontar este problema, fundamentado en que la interconexión existente entre los biomas humanos, animales y ambientales favorece una mayor diseminación de las resistencias a antibióticos. Conocer las vías de movilización y transmisión de resistencias entre las diversas comunidades bacterianas es esencial para mitigar su dispersión. En los últimos años se ha incrementado el interés por el papel de los bacteriófagos o fagos como potenciales vectores de transferencia horizontal de genes entre bacterias (transducción), y en particular de genes de resistencia a antibióticos (GRAs). Su abundancia, persistencia en el ambiente y ubicuidad los hace perfectos vectores para la transducción de GRAs, y se empieza a considerar la transducción un evento de mayor relevancia en la movilización genética horizontal entre bacterias de lo que inicialmente se pensaba.

A lo largo de los cinco capítulos en los que se ha estructurado esta tesis se profundiza en el papel de los fagos en la transmisión de resistencias, a través del estudio de la abundancia, diversidad y origen de partículas fágicas portadoras de GRAs en biomas humanos, animales y ambientales, siendo los alimentos los grandes protagonistas, debido a que la cadena alimentaria constituye un nexo entre dichos biomas. De los resultados obtenidos se puede concluir que a través de la dieta, las partículas fágicas pueden entrar en organismos humanos y animales e incrementar el número y diversidad de partículas fágicas portadoras de GRAs en el tracto intestinal, desde donde se podrían diseminar a otros órganos y transducir su material genético al entrar en contacto con algún huésped bacteriano sensible. Las partículas fágicas que contienen GRAs pasan, a su vez, al ambiente a través de los desechos humanos y animales, pudiendo contaminar de nuevo los alimentos. Se constituye, así, una vía circular de entrada y salida de partículas fágicas y GRAs siguiendo una ruta oral-fecal-ambiente-oral.

Ante los resultados obtenidos, y la ausencia de normativas en materia de seguridad alimentaria y ambiental que controlen los GRAs o los elementos genéticos que los movilizan, sería necesaria la identificación y monitoreo de las partículas fágicas portadoras de GRAs para evaluar si pueden constituir un riesgo para la salud humana y su contribución a la emergencia global de las resistencias a antibióticos.

ABSTRACT

In recent decades, antibiotic resistance has become one of the biggest threats to global health. The *One-Health* approach has decided to tackle this problem, since the interconnection between human, animal and environmental biomes may favour the spreading of antibiotic resistances. Understanding the pathways of mobilization and transmission of resistances between different bacterial communities is crucial to mitigate its spread. In the recent years, there has been an increasing interest in the role of bacteriophages (or phages) as potential vectors for horizontal gene transfer of genes between bacteria through transduction, particularly in the mobilization of antibiotic resistance genes (ARGs). The ubiquity of phages makes the transduction of ARGs a more relevant event in genetic mobilization between bacteria than initially thought.

The role of phages in the transmission of resistance is studied throughout the five chapters in which this PhD thesis has been structured, especially the study of the diversity of phage particles carrying ARGs in human, animal, and environmental biomes, focusing on food, because the food chain constitutes a nexus between these biomes.

The results obtained allow to conclude through the diet, phage particles can enter human and animal organisms and increase the number and diversity of phage particles carrying ARGs in the intestinal tract, from where they may spread to other human and animal organs and transduce their genetic material upon contact with a sensitive bacterial host. Phage particles containing ARGs could end into the environment through human and animal waste, contaminating these biomes, following the oral-faecal-environment-oral route.

Given the results obtained and the absence of regulations on food and environmental safety that control the ARGs or the genetic elements that mobilize them, it would be necessary to identify and monitor the phage particles carrying ARGs to assess whether they may constitute a risk to human health and their contribution to the global emergence of antibiotic resistance.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>One Health</i> : resistencias a antibióticos	3
1.1.1. Impacto humano en la difusión de antibióticos a nivel global.....	4
1.2. Antibióticos.....	6
1.3. Resistencia a antibióticos	8
1.3.1. Degradación del antibiótico.....	9
1.3.2. Modificación del antibiótico	11
1.3.3. Bombas de eflujo.....	11
1.3.4. Modificación de la diana del antibiótico.....	11
1.3.5. Movilidad de los GRAs	12
1.4. Bacteriófagos	16
1.4.1. Ciclos de replicación.....	19
1.4.2. Inducción del ciclo lítico en un profago	21
1.4.3. Ubicuidad y diversidad.....	22
1.4.3.1. Fagos en el ambiente	23
1.4.3.2. Fagos en humanos	24
1.4.3.3. Fagos en animales.....	24
1.4.4. Transducción	25
1.5. Implicaciones de la interacción bacteriófago-huésped.....	29
1.5.1. Regulación de poblaciones.....	29
1.5.2. Interacción con el sistema inmunológico.....	30
1.5.3. Conversión lisogénica: beneficios para la bacteria huésped	31
1.5.3.1. Bacteriófagos portadores de GRAs.....	32
1.6. Resistoma en los viomas ambientales, humanos y animales	33
1.6.1. Resistoma ambiental	35
1.6.2. Resistoma humano.....	36
1.6.3. Resistoma animal	37
1.6.4. Resistencias en alimentos: importancia de la cadena alimentaria.....	37
2. OBJETIVOS	41

3. INFORMES.....	45
3.1. Informe sobre el factor de impacto	47
3.2 Informe de participación en las publicaciones.....	48
4. RESULTADOS	51
4.1. Capítulo 1:	
Descifrando las consecuencias de los bacteriófagos en muestras humanas.....	53
4.2. Capítulo 2:	
Empaquetamiento de genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas infecciosas aisladas de productos cárnicos y heces de pollo.....	69
4.3. Capítulo 3:	
El hígado de los pollos puede ser un reservorio de bacteriófagos y partículas fágicas con genes de resistencia a antibióticos	87
4.4. Capítulo 4:	
Resistencia a antibióticos en la fracción vírica de productos lácteos y de una bebida vegetal.....	105
4.5. Capítulo 5:	
Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas procedentes de los ecosistemas marinos antártico y mediterráneo	117
5. DISCUSIÓN GENERAL	139
6. CONCLUSIONES.....	153
7. BIBLIOGRAFÍA.....	157
8. ANEXOS	193
8.1. Anexo 1: Otras publicaciones del doctorando.....	195
8.2. Anexo 2: Medios de cultivo y tampones.....	199
8.3. Anexo 3: Protocolos realizados	207
8.4. Anexo 4: Reacciones de qPCR	217
8.5. Anexo 5: Cebadores y sondas de qPCR	223

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATG	Agentes de transferencia de genes
BLEA	β -lactamasas de espectro ampliado
CATs	Cloranfenicol acetiltransferasas
CG	Copias genómicas
CrAssphage	En inglés, <i>Cross-Assembly phage</i>
Ct	Umbral de ciclo (<i>cycle threshold</i>)
CTX	Toxina colérica
Da	Dalton
DHPS	Dihidropteroato sintasa
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad europea de seguridad alimentaria
EGMs	Elementos genéticos móviles
EIC	Elementos de integración conjugativa
EMA	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Cultura
FMI	Fondo monetario internacional
g	Gramo
GRAs	Genes de resistencia a antibióticos
Gubaphage	En inglés, <i>Gut bacteroidales phage</i>
h	Horas
ICTV	Comité internacional de taxonomía de virus
IG	Islas genómicas
IPM	En inglés, <i>Imipenemase Metallo-β-lactamase</i>
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
kb	Kilobases
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LOD	Límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>)
LP	Cebador 3' – 5' (<i>Lower primer</i>)

LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MCE	Ésteres mixtos de celulosa (<i>mixed cellulose esters</i>)
MDR	Bombas de resistencia a múltiples fármacos
ml	mililitros
mm	milímetros
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
MSA	Agar Modificado de Scholtens (<i>Modified Scholtens Agar</i>)
MSB	Caldo Modificado de Scholtens (<i>Modified Scholtens Broth</i>)
NDM	En inglés, <i>New Delhi Metallo-β-lactamase</i>
nm	Nanómetros
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
O/N	En inglés, <i>Overnight</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas de unión a penicilina
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PES	Poliétersulfona
PRPs	Proteínas repetitivas de pentapéptidos
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RD	Real decreto
SaPIs	Islas de patogenicidad en <i>S. aureus</i>
spp	Especie
TGH	Transferencia genética horizontal
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFP	Unidades formadoras de calvas de lisis
UP	Cebador 5' – 3' (<i>Upper primer</i>)
UV	Ultravioleta
VIM	En inglés, <i>Verona Integron-encoded-Metallo-β-lactamases</i>
VLP	Partículas virales (<i>Virus like particles</i>)
°C	Grados centígrados
μl	microlitro
μm	micrómetro

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *One Health*: resistencias a antibióticos

En la naturaleza, los microorganismos presentan diversas estrategias para sobrevivir a las posibles adversidades de su entorno o a la competencia con otros microorganismos. Las estrategias desarrolladas van desde una interacción mutualista con otros microorganismos residentes, hasta la producción de sustancias que pueden llegar a inhibir el crecimiento (bacteriostático) o matar (bactericida) a los microorganismos competidores. Entre estas sustancias destacan los antibióticos, producidos por el metabolismo secundario de bacterias y hongos, que proporcionan a sus productores una serie de ventajas competitivas, como una mayor accesibilidad a los nutrientes de su entorno y mayor espacio para su crecimiento (Mullis et al., 2019; Nicolaou & Rigol, 2018).

El ser humano se ha beneficiado de la capacidad microbiana de sintetizar antibióticos, utilizándolos para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, permitiendo hacer frente a una de las principales causas de mortalidad de las últimas décadas. Sin embargo, el uso masivo de antibióticos con diversos fines ha contribuido a la dispersión de antibióticos en el medio ambiente, ejerciendo una elevada presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas naturales (WHO, 2022). Esta presión selectiva ha desembocado en la generación de bacterias resistentes o multirresistentes a los antibióticos, lo que dificulta o imposibilita el tratamiento de enfermedades que hasta hace poco tiempo se consideraban fácilmente tratables con los antibióticos disponibles.

El auge de las resistencias a antibióticos a nivel global preocupa especialmente en los últimos años ya que se observa un incremento en el número de decesos debido a dichas resistencias (sólo en la Unión Europea se estiman unas 25000 muertes/año) (Blair et al., 2015). La resistencia a antibióticos implica además un incremento de los costes hospitalarios, al ser necesaria la utilización de nuevos fármacos, de equipos especializados o estancias hospitalarias más prolongadas, originando también un impacto económico en la sociedad (Prestinaci et al., 2015).

Diversos organismos internacionales, como la organización mundial de la salud (OMS), el Fondo Monetario Internacional (FMI), el Banco Mundial, e incluso el G8, consideran que la resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas de salud pública en el siglo XXI (Aslam et al., 2021). Para afrontar este problema, la OMS, en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Cultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), han acuñado el concepto “Una sola Salud” (*One Health*). *One Health* es un enfoque colaborativo, multisectorial y transdisciplinario para obtener una solución al problema de la resistencia a antibióticos, sin limitarlo al campo de la medicina, ya que hace

referencia a la interconexión que existe entre las personas, los animales, las plantas y su ambiente compartido (Fig. 1) (WHO, 2017a).

Desde la iniciativa *One Health* ha surgido un nuevo concepto, el de *Global Health*, que aboga por la necesidad de estrategias políticas y socioeconómicas a nivel mundial, que deben ser tomadas por todos los países e instituciones internacionales en su conjunto, a fin de lograr una salud igualitaria para todo el planeta (Koplan et al., 2009). En este ámbito, *One Health* actuaría a un nivel más local, donde las acciones pueden implementarse de forma mucho más fácil y rápida que al nivel de *Global Health*, que requiere de acuerdos internacionales para su implementación (Hernando-Amado et al., 2019).

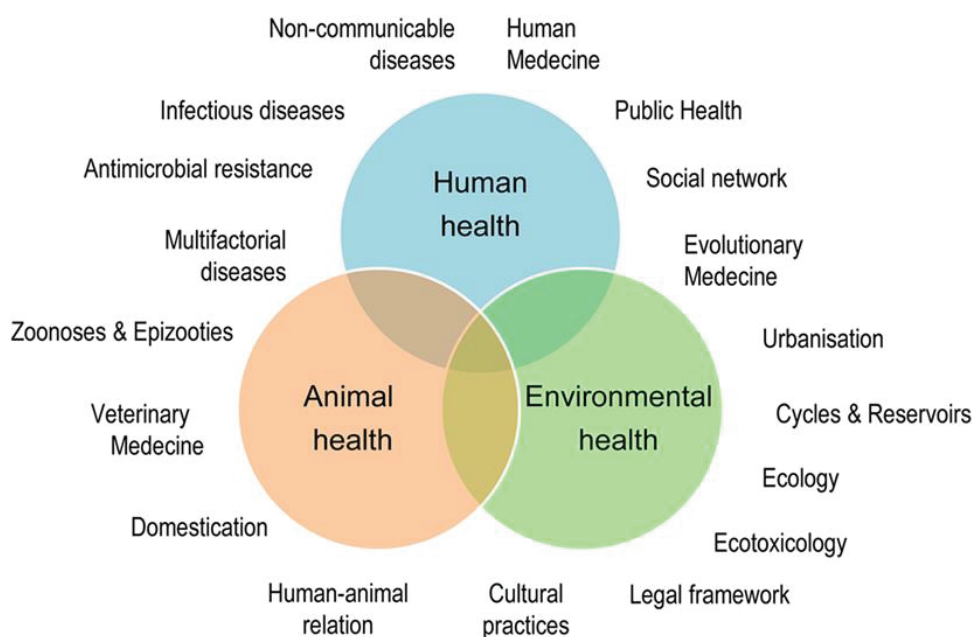


Figura 1. Ámbitos englobados en el concepto *One Health* (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

1.1.1. Impacto humano en la difusión de antibióticos a nivel global

La resistencia a antibióticos es un mecanismo de protección y supervivencia que los microorganismos llevan desarrollando desde hace millones de años (D'Costa et al., 2011). Un ejemplo de ello es el descubrimiento de bacterias resistentes a antibióticos en muestras obtenidas de permafrost o de bloques de hielo extraídos de cuevas (Paun et al., 2021), demostrando que la resistencia a antibióticos es muy anterior a la aparición de la raza humana.

Sin embargo, desde que la humanidad ha comenzado a utilizar los antibióticos y ha intensificado su uso en diferentes ámbitos (Fig. 2), los antibióticos se han diseminado en

diversos ecosistemas. Entre las principales fuentes que intervienen en la dispersión de antibióticos a nivel global destacan:

- **Medicina humana:** Los antibióticos son el principal tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, en muchos casos se utilizan durante un tiempo mayor al estrictamente necesario, se finaliza el tratamiento antes de lo recomendado, se usan antibióticos para tratar infecciones que no requieren terapia antibiótica (infecciones víricas), o se utiliza un antibiótico inapropiado para una determinada infección. Además, en muchos países los antibióticos se pueden conseguir sin ningún tipo de prescripción médica, y al tratarse de un fármaco fácilmente accesible y de bajo coste, se incrementa su uso (Ventola, 2015). El uso intensivo de antibióticos en hospitales también genera múltiples residuos, que pueden llegar al medio ambiente si el tratamiento de las aguas residuales hospitalarias es ineficiente (Zhang et al., 2020).
- **Ganadería y agricultura:** Además de su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en veterinaria, los antibióticos han sido usados como promotores del crecimiento animal. Aunque esta práctica está prohibida en la Unión Europea desde el año 2006 (Castanon, 2007; The European Parliament and the council of the European Union, 2003), todavía hay países que la utilizan (Muurinen et al., 2021). La creciente demanda de productos cárnicos y piscícolas ha derivado en una sobreproducción animal, y las condiciones de cría intensiva de muchas granjas y piscifactorías, donde numerosos animales están ubicados juntos en espacios muy reducidos, incrementa el contacto entre ellos y favorece la propagación de enfermedades, por lo que se requiere tratamientos antibióticos, en ocasiones profilácticos (Bengtsson & Greko, 2014). Además, en acuicultura, los residuos de antibióticos, al ser excretados por los animales, pasan directamente al medio acuático, que pueden ser vertidos a cursos de aguas naturales (Santos & Ramos, 2018). El uso de abonos y fertilizantes orgánicos, en muchas situaciones procedentes de deshechos animales, pueden contener residuos de antibióticos que pueden terminar en el suelo afectando a las poblaciones naturales (Jauregi et al., 2021). Estos residuos pueden terminar en los productos agrícolas, que pueden ser alimentos que se consuman crudos o poco cocinados.
- **Aguas residuales:** Muchos residuos de antibióticos presentan una elevada persistencia en el ambiente y además son excretados por los humanos o animales en su forma activa, terminando en las plantas de tratamiento de aguas residuales. El tratamiento aplicado a las aguas residuales es incapaz de eliminar la totalidad de los residuos de antibióticos, quedando restos en los lodos y aguas, que posteriormente pueden reutilizarse, utilizarse como fertilizantes, etc. (Polianciuc et al., 2020).

- Industria farmacéutica: La elaboración de antibióticos genera residuos que si no son tratados correctamente, pueden ser liberados al ambiente y contaminar masas de agua. A nivel industrial los residuos de antibióticos generados son muy superiores a los generados por la población (Larsson & Flach, 2021).

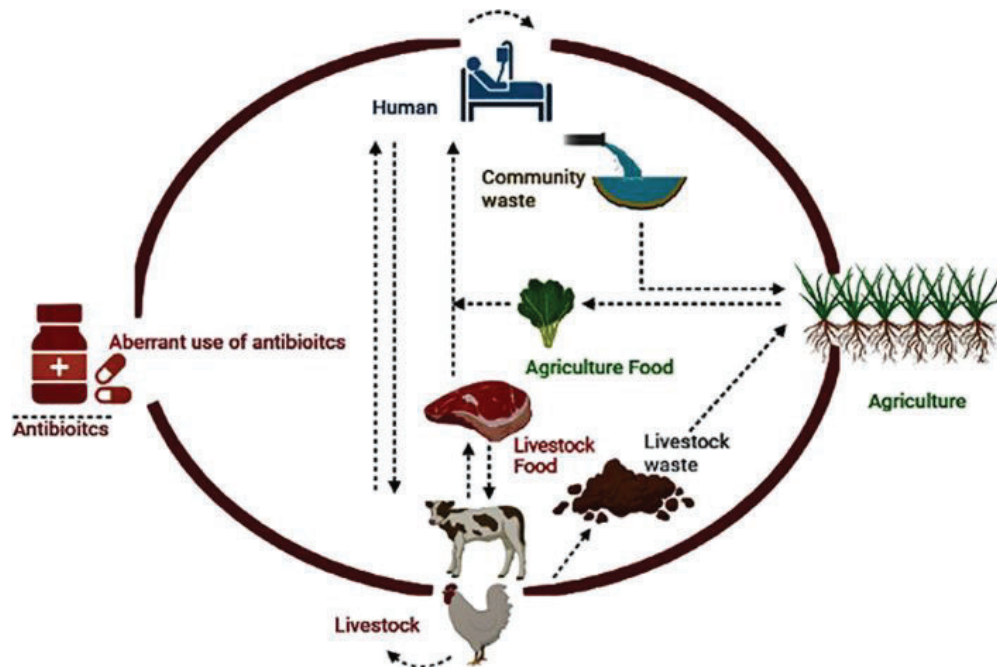


Figura 2. Uso de antibióticos y potenciales vías de diseminación de resistencias (Aslam et al., 2021).

1.2. Antibióticos

Durante el siglo XIX una de las principales causas de mortalidad en la población eran las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos, como la tuberculosis, la sífilis o la neumonía. En este contexto social surgió la necesidad de buscar tratamientos a estas enfermedades, y fue en 1909 cuando el científico alemán Paul Ehrlich descubrió el primer antimicrobiano, la arsfenamina (o Salvarsan), que fue utilizado a partir de 1910 en el tratamiento de la sífilis, siendo el antimicrobiano más utilizado hasta la década de 1940, época en la que comienza el auge de la penicilina, antimicrobiano descubierto en 1928 por Alexander Fleming (Zaffiri et al., 2012). A partir de entonces, se descubrieron y desarrollaron una gran diversidad de antibióticos con diferentes mecanismos de acción, tanto para microorganismos gram-positivos como gram-negativos, y que han sido ampliamente utilizados en medicina humana y animal (Abushaheen et al., 2020; Kapoor et al., 2017).

De forma resumida, podemos clasificar los antibióticos según su mecanismo de acción en los siguientes grupos:

- **β -lactámicos:** Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana impidiendo la generación de la capa de peptidoglicano. El peptidoglicano está formado por largas cadenas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidas a través de tetrapéptidos. En la síntesis del peptidoglicano intervienen unas enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas, conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs). Los β -lactámicos se unen irreversiblemente al sitio activo de las PBPs, impidiendo la síntesis del peptidoglicano, al presentar una estructura molecular análoga a la D-alanil-D-alanina, aminoácido terminal de la cadena peptídica al que se unen las PBPs para formar la capa de peptidoglicano. A este grupo pertenecen antibióticos como la penicilina, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos.
- **Glicopéptidos:** También inhiben la síntesis de la pared celular. En este caso el glicopéptido impide la unión de la D-alanil-D-alanina a las PBPs, evitando la formación del peptidoglicano. La vancomicina es un ejemplo de estos antibióticos, eficaces contra bacterias gram-positivas.
- **Sulfonamidas:** Inhiben la ruta biosintética del ácido fólico, imprescindible en la síntesis de precursores del ADN y ARN. En la ruta de síntesis, la sulfonamida se une a la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), impidiendo la unión del ácido para-aminobenzoico y con ello la síntesis de folato. Son muy utilizados en medicina humana y veterinaria.
- **Quinolonas y fluoroquinolonas:** Inhiben la síntesis de ADN impidiendo la acción de enzimas como la ADN girasa (fluoroquinolonas) o la topoisomerasa IV (quinolonas), provocando un superenrollamiento positivo excesivo del ADN, afectando a su correcta formación y replicación, dando lugar a la muerte celular. Se trata de antibióticos de amplio espectro eficaces contra bacterias gram-positivas y gram-negativas.
- **Tetraciclinas:** Inhiben la síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad ribosómica 30S. Una vez consiguen entrar al citoplasma celular, las tetraciclinas se unen al sitio A de la subunidad ribosómica 30S e impiden la traducción de proteínas. Son efectivas contra gram-positivos.
- **Aminoglucósidos:** Mecanismos de acción similar a las tetraciclinas, inhibiendo la síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad ribosómica 30S. Efectivos contra gram-positivos. Ejemplos de aminoglucósidos son la estreptomina, kanamicina, gentamicina o amikacina.
- **Fenicoles:** Inhiben la síntesis proteica mediante su unión a la subunidad ribosómica 50S. En este grupo destaca el cloranfenicol.
- **Polimixinas:** Alteran la estructura de la membrana celular. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa está cargado negativamente. Las polimixinas tienen carga

positiva, y al interaccionar con la membrana externa la desestabilizan, haciéndola más permeable, desencadenando un desequilibrio en la ósmosis de la bacteria que provoca la muerte celular.

1.3. Resistencia a antibióticos

Anteriormente se ha comentado que la resistencia a antibióticos es un mecanismo natural que lleva ocurriendo desde hace millones de años. Sin embargo, a pesar de que el descubrimiento de los antibióticos ha permitido a la humanidad hacer frente a una de las principales causas de mortalidad, la mayor consecuencia de su uso generalizado es su dispersión por el medio ambiente, aumentando el contacto con los microorganismos y seleccionando aquellos que sean resistentes.

La resistencia a antibióticos puede ser **intrínseca**, innata de la propia bacteria, donde sus propias características funcionales o estructurales le proporcionan la resistencia. Un ejemplo lo encontramos en la resistencia a los β -lactámicos de *Mycoplasma spp.* que, al no disponer de pared celular, hace inviable la actuación de este tipo de antibióticos (Abushaheen et al., 2020). Por otro lado, las resistencias también pueden ser **adquiridas**. En este caso pueden ser debidas a mutaciones o a la incorporación de genes que confieran resistencia a antibióticos mediante mecanismos de transferencia genética horizontal (TGH).

Las **mutaciones** en el cromosoma pueden ocurrir de forma espontánea o bien por la acción de algún agente externo físico, como la radiación ultravioleta (UV), o químico (especies reactivas del oxígeno, agentes deaminantes y alquilantes, etc.), ocasionando cambios en la bacteria que pueden alterar la diana del antibiótico dando lugar a la resistencia (Cesur & Demiröz, 2013; Watford & Warrington, 2022).

Los **mecanismos de TGH** permiten a las bacterias transferir genes de resistencia a antibióticos (GRAs) entre otros. Estos mecanismos han tenido una elevada implicación en la evolución bacteriana al constituir una de las principales vías de intercambio genético entre bacterias, no sólo de la misma especie, sino entre diferentes géneros o familias (Hall et al., 2017). Se abordarán con más detalle en el apartado **1.3.5** de esta memoria.

Para garantizar su subsistencia, las bacterias han sido capaces de desarrollar diferentes estrategias para defenderse de la acción de los antimicrobianos, como la degradación del antibiótico, modificación del antibiótico o su diana, así como la utilización de mecanismos que expulsan el antibiótico (bombas de eflujo) (Fig.3).

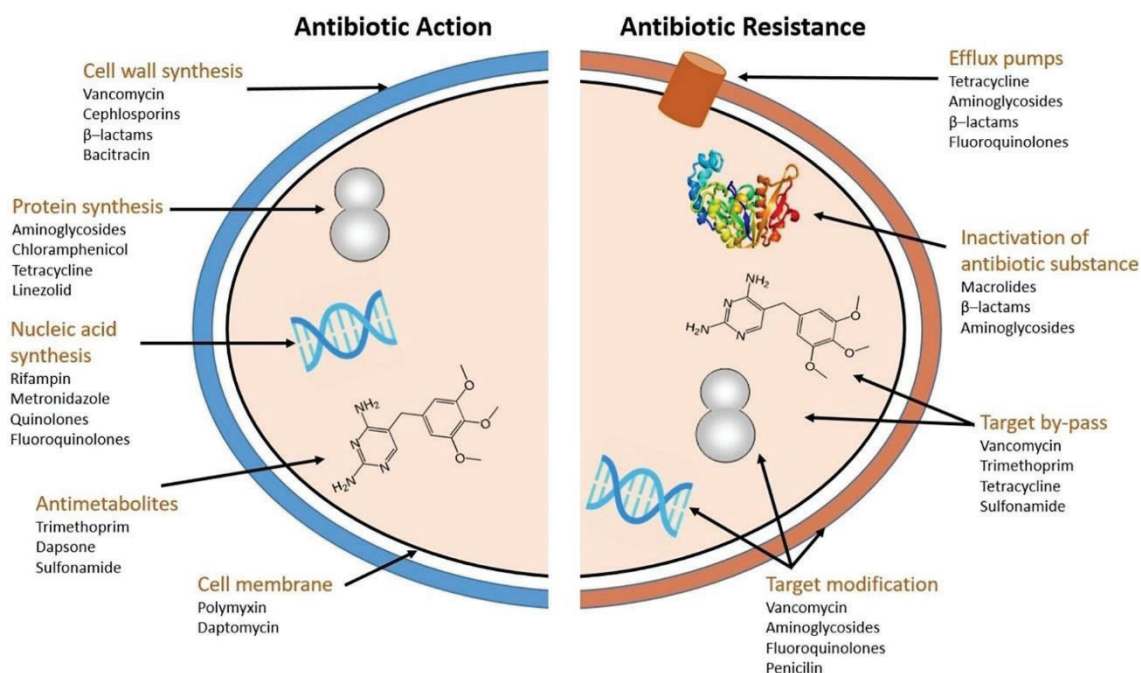


Figura 3. Dianas de antibióticos (izquierda) y mecanismos de resistencia (derecha) (Uluseker et al., 2021).

Muchas de estas funciones están codificadas en genes específicos (GRAs). En el siguiente apartado se definen los mecanismos de resistencia más frecuentes y los genes que los codifican, **indicando en negrita aquellos GRAs analizados en esta tesis.**

1.3.1. Degradación del antibiótico

Es el mecanismo más utilizado en la resistencia a antibióticos β -lactámicos. La bacteria sintetiza enzimas, las β -lactamasas, que destruyen el antibiótico mediante la hidrólisis de los enlaces éster y amida del anillo β -lactámico, que forma parte de la estructura de varias familias de estos antibióticos. Los genes que codifican las β -lactamasas se denominan "*bla*", seguidos del nombre específico de la enzima, y son un grupo de genes ampliamente distribuidos y que contribuyen significativamente a la problemática global de las resistencias a antibióticos, razón por la que se han incluido en los análisis de esta tesis. Se han descrito más de 1000 tipos de β -lactamasas, dividiéndose en 4 grupos principales (Munita & Arias, 2016):

- Clase A: Son las primeras descritas y ampliamente distribuidas en enterobacterias. La primera en descubrirse fue **TEM-1** (abreviación de "Temoneira", nombre del primer paciente donde se reportó) y tiene actividad penicilinasas. El uso de nuevos β -lactámicos con mayor espectro de acción ha favorecido la evolución de las β -lactamasas y a partir de TEM-1 han derivado muchas nuevas, como TEM-3, que se

trata de una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA), que además de penicilinas, tiene la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación. Dentro de las BLEA destacan las cefotaximasas, codificadas por los genes **CTX-M** (de los que se han descrito cientos de variantes). Al contrario que otras BLEA, como TEM-3, las **CTX-M** no derivan de la TEM-1, y se ha estimado su origen en el género *Kluyvera* (enterobacteria), transfiriendo esta resistencia mediante mecanismos de TGH a otras enterobacterias. Como consecuencia, se ha producido una rápida expansión y propagación de los genes **CTX-M**, convirtiéndose en una de las BLEA predominantes, y siendo responsables de la resistencia a cefalosporinas en especies como *Klebsiella pneumoniae* o *Escherichia coli* (Munita & Arias, 2016).

- Clase B: Son metalo- β -lactamasas que utilizan un ion metálico (normalmente Zinc) como cofactor en la degradación del anillo β -lactámico y son efectivas contra carbapenémicos. En este grupo destacan las enzimas **VIM** (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*), **NDM** (*New Delhi metallo- β -lactamase*) e **IPM** (*imipenemase metallo- β -lactamase*). A pesar de que inicialmente fueron descritas en *Pseudomonas aeruginosa*, actualmente se encuentran ampliamente distribuidas en numerosas especies de enterobacterias, una diseminación que puede deberse a su asociación con integrones de clase 1 y su localización en elementos genéticos móviles (EGMs) (Balero de Paula et al., 2017; Bonomo et al., 2018).
- Clase C: Formado por enzimas que confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas, ya que tienen actividad cefalosporinasa. El mayor representante de este grupo es la enzima AmpC, codificada por el gen *ampC* que se encuentra comúnmente en el cromosoma de una gran variedad de bacterias gram-negativas y en algunos casos están codificadas en plásmidos (pAmpC). Se trata de una enzima inducible y se expresa en presencia de β -lactámicos (Cesur & Demiröz, 2013; Kapoor et al., 2017).
- Clase D: Formado por enzimas capaces de hidrolizar oxacilina además de penicilina. Se han descrito que algunas enzimas **OXA** son capaces de neutralizar cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos. Además, cuenta con un elevado número de variantes, destacando la variante **OXA-48**, que en las últimas décadas ha sido responsable de la resistencia a carbapenémicos en diferentes especies de enterobacterias de especial relevancia en microbiología clínica (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*) (Evans & Amyes, 2014).

1.3.2. Modificación del antibiótico

Las bacterias inactivan al antibiótico mediante la síntesis de enzimas que alteran químicamente a la molécula de antibiótico, impidiendo que se una a su diana. Es un mecanismo ampliamente distribuido tanto en bacterias gram-positivas como gram-negativas.

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) confieren resistencia a este tipo de antibióticos. Las EMA se clasifican en función de su actividad enzimática y de la zona de acción en acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas (Ramirez & Tolmasky, 2010).

A este grupo también pertenecen las cloranfenicol acetiltransferasas (CATs), que tienen la capacidad de modificar la molécula de cloranfenicol (Munita & Arias, 2016).

1.3.3. Bombas de eflujo

Es un sistema proteico de transporte activo que utiliza el antibiótico como sustrato y lo expulsa de la célula, confiriendo la resistencia. Es un mecanismo que confiere resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixinas. Las bombas de eflujo pueden ser muy específicas, uniéndose exclusivamente a un sustrato concreto, como las bombas Tet, que se unen a tetraciclinas, o pueden presentar un mayor rango de sustratos, siendo capaces de eliminar varios tipos de antibióticos, lo que se denomina bombas de resistencia a múltiples fármacos (bombas MDR) (Blair et al., 2015). El sistema de bombas de eflujo se ha descrito en prácticamente todas las bacterias, que contienen los genes que codifican este sistema en su cromosoma, aunque también se ha descubierto que pueden ser movilizados mediante mecanismos de TGH.

1.3.4. Modificación de la diana del antibiótico

La mayoría de los antibióticos tienen una elevada afinidad por su molécula diana, por lo que la alteración de la misma resulta un método muy eficaz para impedir la acción del antibiótico. Se han descrito resistencia a múltiples antibióticos mediante este mecanismo, y muchos de los genes que confieren su resistencia han sido incluidos en esta tesis por su elevada implicación en la problemática global de resistencias.

Algunas bacterias han conseguido la resistencia mediante la adquisición de genes que codifican moléculas homólogas a la diana, con características funcionales similares a la diana original, pero sin ser inhibida por el antibiótico. Esto es lo que ha ocurrido en las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), donde la adquisición del *cassette*

cromosómico estafilocócico *mec* le ha conferido la resistencia a meticilina. En el cassette se encuentra el gen *mecA*, que codifica la proteína de unión a penicilina PBP2a, homóloga a la PBP original, pero con menor afinidad por el antibiótico, por lo que en su presencia la síntesis del peptidoglicano no será inhibida, confiriendo, así, la resistencia (Stefani et al., 2012). Además, recientemente se ha descubierto una nueva variante del gen *mecA*, el *mecC*, que es capaz de esquivar herramientas de diagnóstico utilizadas para el gen *mecA*, reflejando la capacidad evolutiva de las resistencias a antibióticos en bacterias.

La modificación enzimática del ribosoma por metilación del 16S ARNr confiere resistencia a aminoglucósidos. Este es el caso del gen *armA*, que codifica una metiltransferasa que es responsable de la resistencia a kanamicina y amikacina y se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, detectándose en diversas especies de enterobacterias (Galimand et al., 2005; González-Zorn et al., 2005).

La síntesis de proteínas que se unen a la diana, confiriéndole una protección y evitando así la acción del antibiótico, también constituye un mecanismo de resistencia utilizado por las bacterias. Esto ocurre con la resistencia a tetraciclinas donde genes como *tetO*, *tetM* o *tetW*, codifican la síntesis de proteínas que se unen al ribosoma, y tras su unión le provocan un cambio conformacional que evitan la unión del antibiótico (Munita & Arias, 2016; Wu et al., 2010). Un caso similar se ha detectado en la resistencia a quinolonas, donde los genes *qnr* (*qnrA*, *qnrS*) codifican proteínas (proteínas repetitivas de pentapéptidos o PRPs) que se unen a la topoisomerasa IV y a la ADN girasa, impidiendo la acción del antibiótico sobre estas enzimas esenciales para la replicación del ADN. Se ha descubierto que estas proteínas desligan el antibiótico de las topoisomerasas y se unen a ellas, confiriendo la resistencia (Blair et al., 2015; Redgrave et al., 2014).

La reducción de la afinidad del antibiótico por el sustrato también es un mecanismo de modificación de la diana. Esto se ha descrito en la resistencia a sulfonamidas, donde una mutación en el gen *folP*, que codifica la DHPS, o la adquisición de genes que codifican análogos a dicha enzima, como *sul1*, *sul2*, o *sul3*, dan lugar a una menor afinidad de las sulfonamidas por el sustrato y le confieren a la bacteria una resistencia a este antibiótico (Kim et al., 2019).

1.3.5. Movilidad de los GRAs

La presencia de antibióticos en distintos ambientes acaba ejerciendo una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas, provocando una alteración en la evolución natural de las resistencias e incentivando una mayor movilización de GRAs (Larsson & Flach, 2021). En

principio, todo tipo de genes es susceptible de ser movilizado, siendo de interés aquellos que afectan a la salud humana, como son los genes que codifican para factores de virulencia bacterianos o de GRAs (Carr et al., 2021). En concreto, la movilidad de los GRAs se realiza mediante diversos elementos genéticos. Se conoce como mobiloma al conjunto de todos los EGMs que forman parte de un microbioma, y que participan en la movilidad de genes entre bacterias mediante mecanismos de TGH. A continuación, se indican los EGMs más destacados:

- **Plásmidos:** Son moléculas de ADN extracromosómico, generalmente circularizado, aunque existen descripciones de plásmidos de doble cadena lineal de ADN en algunos géneros bacterianos, como *Streptomyces* o *Borrelia* (Hayakawa et al., 1979; Iyer et al., 2003), y más recientemente en especies como *Salmonella Typhi* o *Enterococcus faecium* (Baker et al., 2007; Fujiya et al., 2021). Su tamaño es muy variable, desde menos de una kilobase hasta megabases y contienen al menos un origen de replicación. Aunque habitualmente no contienen genes esenciales para la vida celular, sí que en muchas ocasiones poseen genes importantes en la supervivencia de la bacteria, como genes de virulencia y uno o diversos GRAs (Carr et al., 2021; Frost et al., 2005).
- **Transposones:** Son secuencias de ADN que tienen la capacidad de moverse de una región cromosómica a otra mediante un proceso denominado transposición, siendo posible gracias a la actividad de una enzima transposasa (Muñoz-López & Garcia-Pérez, 2010). La transposición en ciertos lugares del cromosoma bacteriano puede causar la inactivación de algunos genes o modular la expresión génica, provocando mutaciones, y en ocasiones, cambios fenotípicos. Dentro de los transposones destacan las **secuencias de inserción**, que son los transposones más pequeños (pocas kilobases) en los que dos secuencias repetitivas flanquean una transposasa. Cuando dos secuencias de inserción flanquean un fragmento de ADN que contiene un gen, por ejemplo, un GRA, entonces se habla de transposón compuesto. La capacidad de saltar hace que los transposones también pueden insertarse en plásmidos o en bacteriófagos, lo que permitiría su movilización a otras bacterias (Babakhani & Oloomi, 2018; Carr et al., 2021; Muñoz-López & Garcia-Pérez, 2010).
- **Integrones:** Son elementos genéticos capaces de promover la adquisición y expresión de los genes que los conforman. Están constituidos por los genes que codifican la integrasa, un sitio específico de recombinación para llevar a cabo la integración y un promotor, que realiza la transcripción y expresión del integrón (Domingues et al., 2012a; Domingues et al., 2012b; Stalder et al., 2012). Algunos integrones pueden contener GRAs, como es el caso del integrón de clase 1 que contiene el gen *sul1*, que

confiere resistencia a sulfonamidas y está ampliamente distribuido en diversas especies bacterianas. Esta clase de integrón se ha encontrado en otros elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones (Domingues et al., 2012b).

- **Elementos de integración conjugativa (EIC):** Son elementos habitualmente integrados en el cromosoma bacteriano, caracterizados por ser auto transferibles al contener todos los genes necesarios para su movilización mediante conjugación, además de genes imprescindibles para su integración y escisión (Wozniak & Waldor, 2010). Los EIC también contienen otros genes que pueden conferir algunas ventajas adaptativas a la célula huésped, como GRAs (Johnson & Grossman, 2015).
- **Islas genómicas (IG):** Son fragmentos de ADN que pueden ser movilizados (o no), y muchas de ellas tienen la capacidad de integrarse en el cromosoma bacteriano, escindirse y transferirse a una nueva cepa huésped por mecanismos de TGH (Juhas et al., 2009). Se ha relacionado a las IG en la diseminación genética, destacando genes asociados a virulencia (islas de patogenicidad), a la formación de vías catabólicas y también GRAs (Dobrindt et al., 2004).
- **Agentes de transferencia de genes (ATG) (Fig.4):** Son partículas similares a virus bacterianos (bacteriófagos), que empaquetan y transfieren aleatoriamente fragmentos de ADN del cromosoma bacteriano (Brown-Jaque et al., 2015). Contrariamente a los bacteriófagos, los ATG no requieren de una infección previa para poder generarse, ya que los genes que codifican su producción (proteínas de la cápside y proteínas implicadas en el empaquetamiento de ADN) están localizados en el propio cromosoma bacteriano. Sin embargo, se cree que los ancestros de los ATG han podido ser profagos que han perdido los genes no estructurales y la capacidad de escindirse (Lang et al., 2017). Los ATG son liberados al medio tras la lisis celular y el material genético empaquetado es transferido a una bacteria receptora de la misma especie (Lang et al., 2012). Es destacable que la mayoría de ATG se han identificado en arqueas y α -proteobacterias, siendo una de las especies más estudiadas *Rhodobacter capsulatus*, aunque también se han descubierto en otros géneros bacterianos como *Bacillus* (Bárdy et al., 2020; García-Aljaro et al., 2017; Sherlock et al., 2019).
- **Bacteriófagos (fagos) (Fig. 4):** De los que se hablará en el apartado siguiente.

También se han descrito otros elementos, que no pueden ser considerados EGMs propiamente dichos, pero que participan y contribuyen a la movilización genética (Fig.4):

- **Vesículas de membrana:** También denominadas vesículas extracelulares o exosomas en el caso de células eucariotas. Son elementos esféricos de tamaños comprendidos entre 10-400 nm formados a partir de la membrana externa (gram-negativas) o membrana celular (gram-positivas) que pueden contener proteínas, ADN

o ARN, plásmidos o incluso bacteriófagos, constituyendo una nueva vía de entrada al huésped (García-Aljaro et al., 2017; Liu et al., 2018). Además, al derivar de las membranas celulares, estas vesículas pueden contener receptores para la adhesión fágica, por lo que al ser adquiridos por una bacteria resistente a la infección, ésta puede volverse susceptible a la infección del fago, impulsando también la transferencia genética por esta vía a otras especies bacterianas (Liu et al., 2018).

- **Nanotubos:** Consisten en una especie de salientes o protuberancias tubulares que generan algunas bacterias que les permiten conectarse directamente con otras de la misma especie o incluso de especies diferentes, y realizar un intercambio genético (similar al de un pilus conjugativo) (Dubey & Ben-Yehuda, 2011; Ficht, 2011). Mediante la generación de nanotubos se ha visto que las bacterias son capaces de intercambiar diversos elementos citoplasmáticos, así como material genético (también GRAs) (Dubey & Ben-Yehuda, 2011).

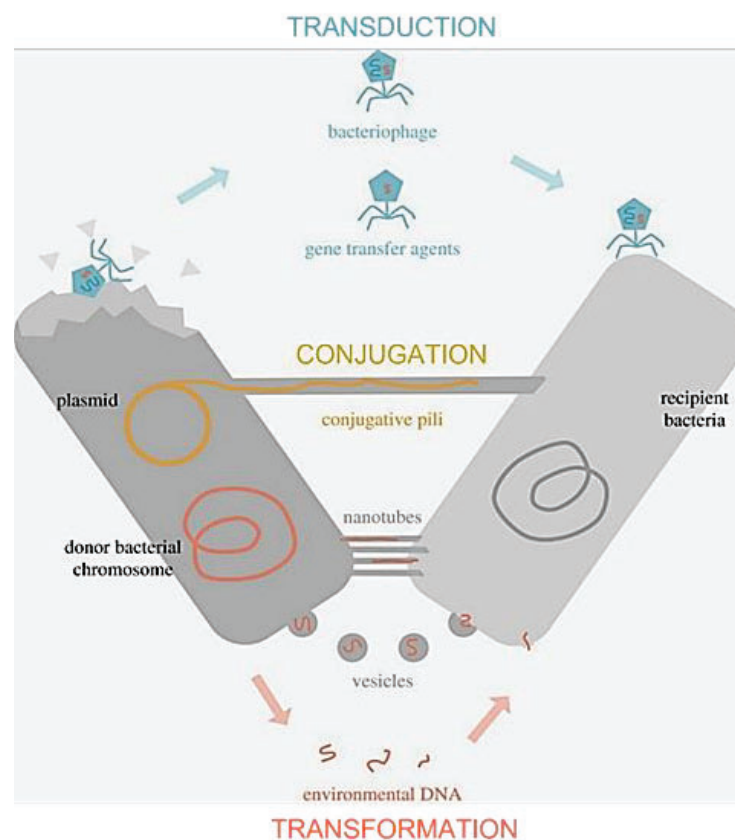


Figura 4: Mecanismos de TGH. En azul la **transducción** mediada por bacteriófagos, y la movilización genética mediada por agentes de transferencia de genes (similares a cápsidas fágicas). En amarillo, la **conjugación** mediada por un pilus conjugativo expresado por un plásmido. En rojo la **transformación** o adquisición de ADN exógeno. Además, también se ha visto que las bacterias son capaces de movilizar material genético a través de vesículas de membrana y nanotubos (rojo). Imagen adaptada de Hall et al., 2017.

En el apartado anterior se ha comentado que las resistencias a antibióticos pueden ser intrínsecas o adquiridas, bien por mutaciones, o por mecanismos de TGH de GRAs. Dentro de los mecanismos de TGH más destacables se encuentran la conjugación, la transformación y la transducción (Fig.4):

- **Conjugación:** Es la transferencia de material genético entre bacterias mediante un *pilus* conjugativo, lo que requiere contacto directo entre ellas. Los EGMs que habitualmente son transferidos mediante la conjugación son los plásmidos y las EIC (Carr et al., 2021). La conjugación se produce cuando la célula donadora posee un plásmido F, que le permite expresar un *pilus* conjugativo, mediante el cual se establece un enlace o canal entre la célula donadora y receptora, transfiriéndose el material genético (plásmido F y otros plásmidos o EIC) (Hall et al., 2017). La conjugación es el mecanismo de TGH más estudiado y uno de los que más contribuye a la movilización de GRAs entre bacterias (von Wintersdorff et al., 2016).
- **Transformación:** es la adquisición de ADN exógeno (fragmentos de ADN extracelular) por parte de una bacteria competente. La capacidad de transformación de bacterias competentes puede estar inducida bajo ciertas condiciones de la propia bacteria, como el estado nutricional o condiciones de estrés, así como condiciones ambientales desfavorables, como la radiación UV, o la presencia de agentes inductores, como algunas proteínas o antibióticos. Mediante la transformación las bacterias competentes pueden adquirir GRAs presentes en el medio tras la lisis de otras bacterias (Charpentier et al., 2011; Johnston et al., 2014).
- **Transducción:** es el mecanismo por el que un fragmento de ADN bacteriano es transferido de una bacteria a otra a través de bacteriófagos. Este mecanismo se detallará en el apartado 1.4.4 de esta memoria.

1.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan bacterias. Son las entidades biológicas más abundantes del planeta y se estima que existen alrededor de 10^{31} fagos que están presentes en todos los ecosistemas donde existan bacterias (Clokic et al., 2011; Dion et al., 2020). Como todos los virus, son parásitos intracelulares estrictos y utilizan la maquinaria de replicación del huésped para multiplicarse. En su fase de virión (partícula viral morfológicamente completa y con capacidad infectiva) están constituidos por material genético, que puede ser ADN o ARN, de doble cadena (bicatenario) o cadena simple (monocatenario), que se encuentra protegido por una cubierta proteica, denominada cápside (Jamal et al., 2019). Algunos bacteriófagos presentan estructuras suplementarias como colas (que pueden ser contráctiles o no y más o

menos largas) o espículas, y ocasionalmente una capa lipídica superficial. Además, su tamaño oscila entre los 20-200 nm (Jamal et al., 2019).

El comité internacional de taxonomía de virus (ICTV) es el encargado de la clasificación de los bacteriófagos. La gran diversidad de los fagos dificulta su categorización y hace que se consideren muchas variables tanto morfológicas (presencia de cola, envolturas, etc.), como su material genético o el tipo de huésped al que infectan (Chibani et al., 2019). No obstante, la clasificación de bacteriófagos más utilizada y ampliamente aceptada se ha realizado acorde a sus características morfológicas y su material genético, que es la que está actualmente en uso (Fig. 5). Sin embargo, ante el auge y disponibilidad de las técnicas de secuenciación masiva, que permiten profundizar en la diversidad de genomas fágicos, esta clasificación se va modificando y ampliando con la detección de nuevas familias y especies hasta ahora desconocidas (Dion et al., 2020; Shang et al., 2021; Simmonds et al., 2017). Un claro ejemplo de esto ocurre con el orden *Caudovirales*, al que pertenecen la mayoría de los fagos descritos hasta la fecha, constituido por fagos con cola y ADN bicatenario, donde hasta hace poco se habían descrito tres familias, *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, y recientemente, mediante estudios metagenómicos, se han detectado nuevas familias (*Autographviridae*, *Demerecviridae*, *Drexelviridae*, *Ackermannviridae*, *Chaseviridae* y *Herelleviridae*), reflejando la importancia de los avances en metagenómica en materia de identificación y detección de virus (Zinke et al., 2022).

El rango de posibles huéspedes de un fago está determinado por la presencia de **receptores** específicos en la superficie de la bacteria huésped (lipopolisacáridos, proteínas, flagelos, *pili*, etc.) que interaccionan con las partículas fágicas, desencadenando el inicio de la infección (Stone et al., 2019). Si un bacteriófago sólo puede unirse a un receptor específico de un grupo bacteriano concreto, lo más probable es que tenga un rango de huéspedes muy estrecho y sólo sea capaz de infectar a una especie o cepa determinada, denominándose fago monovalente. Por el contrario, si es capaz de adherirse a varios receptores diferentes, o a un receptor que esté presente en diversos grupos bacterianos, el bacteriófago tendrá un rango de huéspedes más amplio, llegando a ser capaz de infectar a diferentes especies bacterianas o incluso diferentes géneros, denominándose fagos polivalentes (de Jonge et al., 2019).

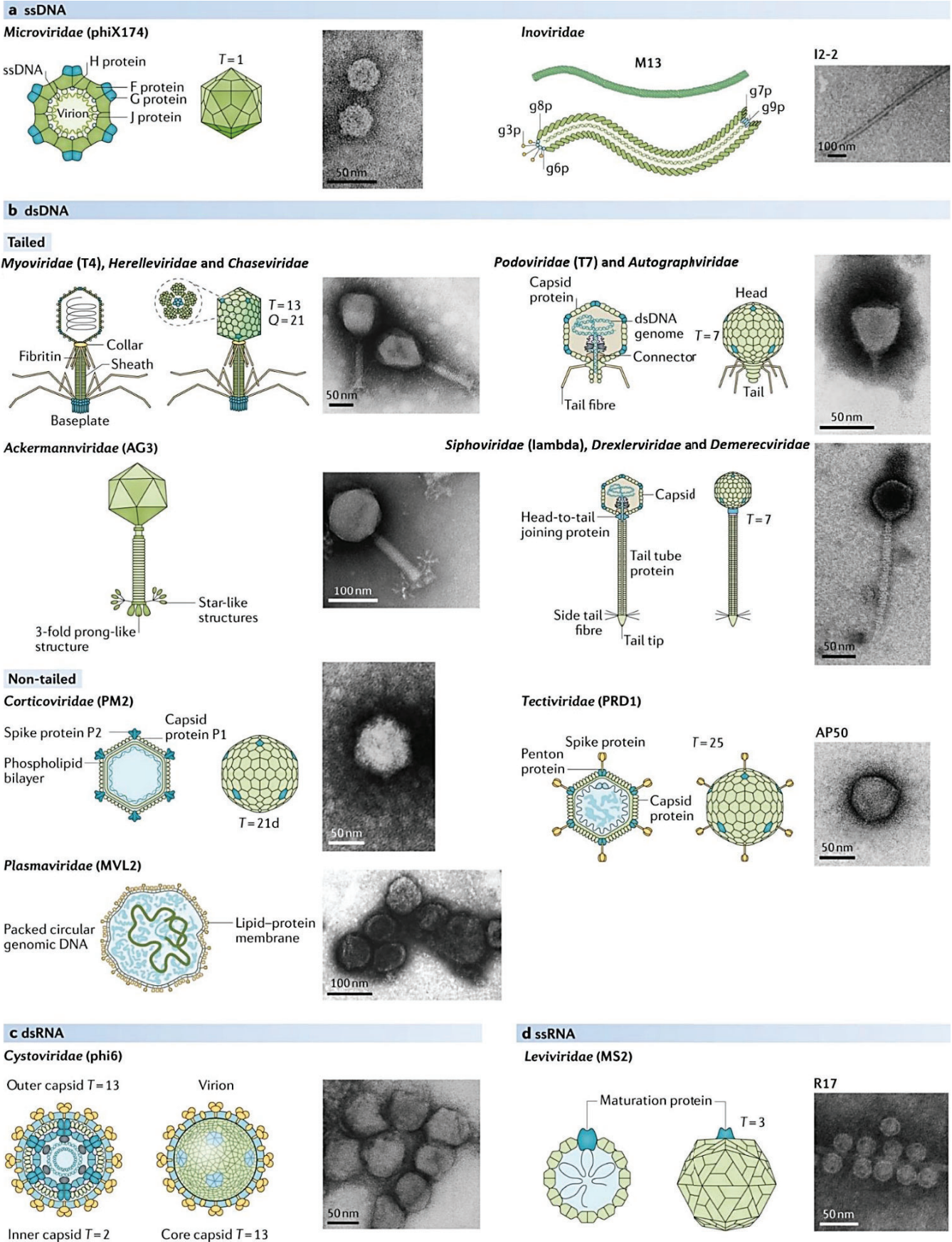


Figura 5. Clasificación de los bacteriófagos según sus características morfológicas y su ácido nucleico. Imagen adaptada de Dion et al., 2020.

1.4.1. Ciclos de replicación

Los bacteriófagos también pueden clasificarse acorde a su ciclo vital en fagos virulentos (ejemplo, fago T4), si sólo se replican mediante un **ciclo lítico**, o fagos atemperados, si siguen el **ciclo lisogénico** (ejemplo, fago *lambda* λ) (Salmond & Fineran, 2015). Los fagos virulentos infectan a la bacteria huésped e inmediatamente desencadenan el ciclo lítico, donde el fago propaga y finalmente termina con la lisis de la bacteria mediante la ruptura de la pared celular, liberando los nuevos viriones al medio (Fig.6). Por el contrario, los fagos atemperados pueden seguir la vía lítica o lisogénica. En esta última, el fago integra su ADN en el cromosoma de la bacteria, permaneciendo en estado latente en forma de “profago”, replicándose a la vez que el cromosoma bacteriano (Fig.6) hasta que estímulos ambientales, generalmente condiciones de estrés, hacen que se escinda y entre en el ciclo lítico.

La duración del ciclo lítico es muy variable y depende de la cepa huésped, de su estado metabólico, así como de las condiciones ambientales, pudiendo llevarse a cabo en tiempos tan reducidos de 40 minutos en colifagos (infectan *E. coli*) (Campbell, 2003), o incluso de varias horas (>8 horas) en el caso de algunos cianofagos (infectan cianobacterias) (Lindell et al., 2007; Suttle & Chan, 1993).

Siguiendo el modelo descrito de uno de los bacteriófagos más estudiados, el fago *lambda*, un fago atemperado tipo *Siphoviridae* (Fig.5) que infecta a *E. coli*, el ciclo de infección se divide en las siguientes fases (Campbell, 2003; Garriss & Henriques-Normark, 2020):

- **Adsorción:** Esta fase se inicia cuando el virión reconoce los receptores específicos en la superficie de la célula huésped. Este proceso de adhesión está influenciado por diversos factores, como el tipo de receptor (lipopolisacárido, flagelos, etc.), características de la placa basal del propio bacteriófago (parte que entra en contacto con el receptor bacteriano), presencia de cofactores, como iones de calcio o magnesio, condiciones de pH, así como de la concentración de fagos y bacterias en el medio.
- **Penetración:** Esta fase se desencadena cuando una proteína degradadora de peptidoglicano asociada al virión origina una perforación en la pared bacteriana. En este momento se produce un cambio en la conformación de las proteínas de la cola, que posibilita que el canal central de la cola penetre la pared bacteriana, llegando hasta la membrana citoplasmática. En este punto, el ácido nucleico del fago abandona la cápside y cruza el canal hasta llegar al citoplasma bacteriano.
- **Latencia:** En esta fase se sintetizan el material genético y las proteínas fágicas. Una vez el ácido nucleico del fago alcanza el citoplasma, la ARN polimerasa del huésped comienza a transcribir una parte del ADN fágico, que se traduce en la síntesis de enzimas y proteínas fágicas. Estas nuevas enzimas fágicas se encargan de inhibir la

síntesis de macromoléculas bacterianas y de encaminar el proceso de replicación hacia la síntesis del ácido nucleico fágico. Durante esta fase se van acumulando en el citoplasma bacteriano moléculas de ácido nucleico del fago y proteínas que constituirán la cápside del fago. El proceso de replicación varía en función de si el ácido nucleico del fago es ADN o ARN, bicatenario o monocatenario.

- **Maduración:** Se produce la formación del futuro virión. Este proceso está dirigido por sistemas de control codificados por el fago. Una vez finalizada la replicación del ácido nucleico viral y la síntesis de proteínas de la cápside, denominadas capsómeros, se produce el ensamblaje de la cápside y el empaquetamiento del material genético en su interior. Posteriormente, se ensamblan de manera secuencial el resto de las proteínas que forman las estructuras del fago.
- **Liberación:** Esta fase comienza con la síntesis de una endolisina fágica que degrada la capa de peptidoglicano de la pared celular, debilitándola y provocando la lisis celular por la acción de la presión osmótica interna de la propia bacteria, facilitando, así, la liberación de la nueva progenie viral.

Como se ha comentado, los fagos atemperados, como *lambda*, pueden seguir otra vía de replicación, el **ciclo lisogénico**. Tras la fase de penetración, el genoma fágico puede mantenerse en el citoplasma, circularizándose en una estructura similar a un plásmido, y acabar integrándose en el cromosoma bacteriano (fase de profago), replicándose sincrónicamente con la célula bacteriana, que pasa a ser una célula lisogénica (Salmond & Fineran, 2015). Durante esta etapa, el profago se encuentra en un estado de latencia (ya que sólo es ADN integrado) y sintetiza represores de la replicación fágica para bloquear el ciclo lítico. La integración del ADN fágico en el cromosoma bacteriano puede aportar múltiples ventajas a la bacteria ya que le proporciona genes que pueden facilitar su adaptación y desarrollo evolutivo (Stone et al., 2019). Este proceso de “simbiosis” se conoce como **conversión lisogénica**. Sin embargo, este estado puede verse alterado por condiciones de estrés que puedan llegar a dañar el cromosoma bacteriano, provocando la escisión del profago y la inducción del ciclo lítico (Garriss & Henriques-Normark, 2020).

También se ha expuesto otra vía de replicación, la pseudolisogenia, que se ha descrito como un estado de desarrollo postergado de un bacteriófago, y que habitualmente tiene lugar en condiciones muy desfavorables para el crecimiento bacteriano, como es la ausencia de nutrientes (Łoś & Węgrzyn, 2012; Miller & Day, 2008; Ripp & Miller, 1997). En esta vía el fago inyecta su material genético en la célula huésped, pero el genoma fágico no se replica (como en el ciclo lítico) ni se integra en el cromosoma del huésped y se replica sincrónicamente con él (como en el ciclo lisogénico), sino que permanece en el interior celular en un estado de pre-profago (de modo semejante a un episoma), donde el genoma viral no es degradado, lo que

permitirá la posterior reanudación del desarrollo del fago cuando las condiciones para el crecimiento bacteriano sean favorables, terminando el estado de pseudolisogenia y desencadenándose una de las dos rutas anteriormente descritas (Feiner et al., 2015)

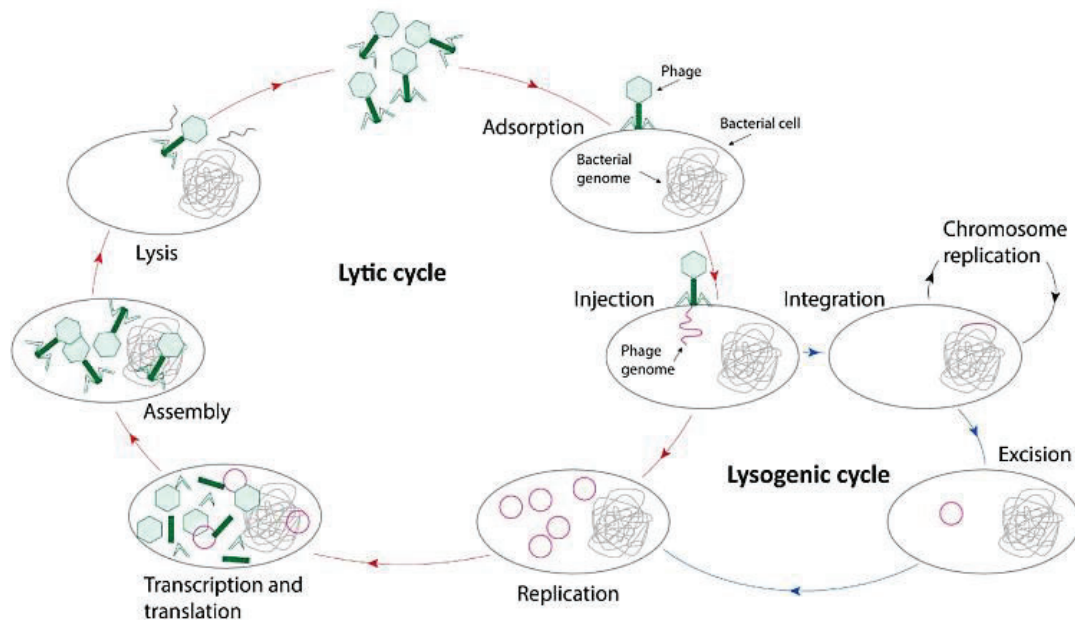


Figura 6. Modelo de ciclo lítico y lisogénico (Garriss & Henriques-Normark, 2020).

1.4.2. Inducción del ciclo lítico en un profago

El ciclo lítico puede desencadenarse o inducirse de forma espontánea o mediante la acción de agentes inductores. Éstos son agentes o sustancias que provocan una alteración en el cromosoma bacteriano, desencadenando una respuesta de reparación del ADN (respuesta SOS) por parte de la bacteria. Al activarse este sistema, el profago comienza a transcribir genes iniciando el ciclo lítico.

Los agentes inductores pueden ser naturales, como la radiación UV, o artificiales, como algunos químicos o antibióticos. Se ha descrito que el uso de algunos antibióticos, como trimetoprima con sulfametoxazol o ciprofloxacina, inducen la respuesta SOS y con ello el ciclo lítico de algunos profagos, como, por ejemplo, los fagos *Stx*, que contienen el gen que codifica para la toxina Shiga (Balasubramanian et al., 2019). Otros antibióticos, como los β -lactámicos, provocan la inducción de profagos en *S. aureus* (Maiques et al., 2006). Además, el uso de algunos aditivos utilizados en la industria alimentaria, como citrato sódico o EDTA, también provocan la inducción de profagos *Stx* (Imamovic & Muniesa, 2012; Lenzi et al., 2016). A nivel

de laboratorio, es ampliamente utilizada la mitomicina C, un compuesto anticancerígeno que causa entrecruzamiento entre las cadenas de ADN y, al actuar sobre el ADN, activa la respuesta SOS, provocando la inducción de los profagos (Imamovic et al., 2016).

1.4.3. Ubicuidad y diversidad

Los bacteriófagos se encuentran en todos los biomas donde se localicen sus huéspedes bacterianos. Su número y concentración es muy variable en función de los diversos ecosistemas, pero si se estima que es al menos 10 veces superior al de las bacterias (Tabla 1).

La microscopía de epifluorescencia y el microscopio electrónico de transmisión, sumado a las nuevas técnicas de secuenciación genómica y análisis metagenómico, han permitido profundizar en la diversidad fágica, demostrando que los bacteriófagos son mucho más abundantes de lo que inicialmente se pensaba (Ács et al., 2020; Ortmann & Suttle, 2009; Srinivasiah et al., 2008). Son los virus más abundantes en la mayoría de viomas (Angly et al., 2006; Bi et al., 2022; Dion et al., 2020; López-Pérez et al., 2017; Spencer et al., 2022) y desempeñan papeles importantes en la regulación y estructura poblacional de los diferentes biomas, tal como se abordará con mayor profundidad en el apartado **1.5** de esta memoria.

Tabla 1. Ubicuidad y abundancia de bacteriófagos

Origen	Concentración	Referencia
Aguas oceánicas	10 ⁵ -10 ⁷ VLP/ml agua	(Dion et al., 2020)
Suelos	10 ³ -10 ⁹ VLP/g suelo	(Williamson et al., 2017)
Agua residual	10 ⁷ -10 ⁹ VLP/ml agua	(Ottawa et al., 2007)
Cavidad Oral	≈ 10 ⁸ VLP/ml de saliva	(Edlund et al., 2015)
Tracto gastrointestinal	≈ 10 ⁹ VLP/g heces	(Shkoporov & Hill, 2019)
Sistema nervioso	≈ 10 ⁴ VLP/ml líquido cefalorraquídeo	(Ghose et al., 2019)
Sistema urinario	≈ 10 ⁷ VLP/ml orina	(Santiago-Rodriguez et al., 2015)
Piel	≈ 10 ⁶ VLP/cm ² piel	(Zárate et al., 2017)
Rumen	10 ⁷ -10 ⁸ VLP/ml líquido ruminal	(Gilbert et al., 2020)

VLP: Partículas virales (*Virus like particles*)

1.4.3.1. Fagos en el ambiente

Uno de los ecosistemas naturales más importantes por su riqueza y variedad de organismos son los **mares y océanos**. En los ecosistemas oceánicos los virus son las entidades más abundantes, de las cuales la mayoría corresponden a bacteriófagos (Suttle, 2007). Estudios basados en el análisis metagenómico de aguas marinas de diferentes localizaciones y profundidades han revelado que dentro de las secuencias conocidas (muchas permanecieron sin clasificar), el orden *Caudovirales* (fagos ADN bicatenario con cola), es el dominante, siendo la familia *Myoviridae* la mayoritaria, seguida por *Podoviridae* y *Siphoviridae* (Garin-Fernandez et al., 2018; López-Pérez et al., 2017). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las secuencias identificadas pertenecen a fagos del orden *Caudovirales*, también existe una elevada presencia de virus sin cola (Brum et al., 2013). Precisamente a éstos últimos se les atribuye la elevada presencia de secuencias sin identificar que se obtienen en los análisis de viomas marinos (tanto de ADN como ARN) (Brum et al., 2013).

Otro ecosistema con una gran diversidad microbiana es el **suelo**, aunque varía en función del tipo de suelo. En suelos áridos, como los desiertos, se han estimado alrededor de 10^3 partículas virales/gramo, mientras que en suelos de bosques la concentración viral aumenta hasta 10^9 partículas virales/gramo, asociado también a una mayor diversidad de huéspedes microbianos (Williamson et al., 2017). Mediante microscopía electrónica se ha visto que en suelos más boscosos y fértiles predominan los fagos con cola, mientras que en el análisis de uno de los suelos agrícolas se observó la predominancia de partículas fágicas sin cola (Williamson et al., 2005, Williamson et al., 2017). No obstante, contrario al estudio anterior, en otro estudio sobre tipos de suelo similares (aunque distinta distribución geográfica) se ha visto un predominio de fagos sin cola, perteneciendo la mayoría al tipo *Microviridae* (ADN monocatenario), tras su identificación mediante un análisis metagenómico (Reavy et al., 2015). La elevada presencia de fagos de ADN monocatenario sin cola también se ha visto en el análisis metagenómico de otros suelos agrícolas (Kim et al., 2008), evidenciando que las herramientas de secuenciación y análisis de datos son esenciales en la ampliación de conocimientos sobre la diversidad fágica y que todavía desconocemos la diversidad real de estos ecosistemas.

Las **aguas residuales** y las plantas de tratamiento de dichas aguas también son considerados ecosistemas con una gran concentración fágica. En lodos activos de depuradora se ha estimado una concentración de 10^7 - 10^9 partículas virales/ml (Tabla 1), siendo en su mayoría bacteriófagos. Mediante técnicas de secuenciación se ha detectado que la mayoría de las secuencias en el viroma de aguas residuales y lodos activados corresponden a fagos del orden *Caudovirales* (Otawa et al., 2007; Tamaki et al., 2012).

1.4.3.2. Fagos en humanos

El tracto intestinal humano es un ecosistema donde conviven una gran diversidad de microorganismos y mediante el estudio del viroma fecal humano se ha estimado una concentración de 10^8 - 10^{10} partículas virales/gramo de materia fecal (Tabla 1). La mayoría de las secuencias del viroma fecal corresponden a bacteriófagos, principalmente del orden *Caudovirales* y otros de las familias *Microviridae* e *Inoviridae* (fagos sin cola y fagos filamentosos respectivamente) (Gregory et al., 2020). No obstante, es remarcable que un 90% de las secuencias permanecieran sin clasificar (Gregory et al., 2020), reflejando la enorme diversidad fágica que aún permanece sin desvelar. A nivel intestinal, se ha descrito que los fagos *crAssphage* (*Cross Assembly phage*) constituyen el grupo predominante, aunque recientemente se ha descubierto un nuevo grupo de fagos intestinales, que también predominan en el intestino humano pero a niveles inferiores a *crAssphage*, denominados fagos *Gubaphage* (*Gut bacteroidales phage*), siendo ambos bacteriófagos que infectan al género *Bacteroides* (Camarillo-Guerrero et al., 2021; Dutilh et al., 2014).

El tracto intestinal no es el único sistema del cuerpo humano donde se han detectado fagos, como se ve reflejado en el viroma de la cavidad oral (Pride et al., 2012), el tracto respiratorio (Tzani-Tzanopoulou et al., 2021; Willner et al., 2009) o cutáneo (Foulongne et al., 2012). A estos datos contribuyen también los resultados que se presentarán en uno de los estudios realizados en esta tesis (**Capítulo 4.1**)

1.4.3.3. Fagos en animales

El mundo animal es muy diverso y el estudio de fagos se ha centrado principalmente en animales que tienen una mayor conexión con el ser humano, como los animales de granja usados para producción alimentaria, entre ellos diversas especies de rumiantes, aves y cerdos. En **rumiantes** se ha estimado por microscopía electrónica que existen 10^7 - 10^8 partículas virales/ml de líquido ruminal (Tabla 1), la mayoría del orden *Caudovirales*. Mediante secuenciación del viroma se confirmó que los más predominantes eran los fagos de la familia *Siphoviridae* (Gilbert et al., 2020).

La microbiota intestinal de **pollos** se considera una fuente de diversos géneros y especies bacterianas, algunos de ellos patógenos tanto de animales como de humanos (*Salmonella*, *Campylobacter* o *E. coli*). En el tracto intestinal de pollos se han identificado fagos capaces de infectar a diversas especies bacterianas, sobre todo enterobacterias, entre ellas a *E. coli* (colifagos), y diversas especies de *Salmonella* (Cortés et al., 2015; Sevilla-Navarro et al.,

2020; Sørensen et al., 2020), perteneciendo la mayoría de ellos a las familias *Myoviridae* y *Podoviridae* (Gilroy et al., 2021).

En **cerdos** se han detectado una elevada prevalencia de fagos capaces de infectar a diversas especies de *Salmonella*, reportándose en algunos estudios alrededor de 10^9 unidades formadoras de calvas de lisis (UFP)/ml de agua residual en granjas de cerdos (Cortés et al., 2015; Switt et al., 2013).

1.4.4. Transducción

La enorme diversidad y ubicuidad de los fagos, sumada a su gran persistencia en el ambiente, los convierte en uno de los vectores idóneos para la movilización de material genético. La transferencia genética horizontal de genes mediada por bacteriófagos recibe el nombre de **transducción**. Es el mecanismo por el que un fragmento de ADN bacteriano es transferido de una bacteria a otra a través de bacteriófagos, por lo que contribuye significativamente al intercambio genético entre bacterias. La dimensión del fragmento de ADN bacteriano que puede ser empaquetado por las partículas fágicas está limitado por el propio tamaño de las cápsides, y puede variar desde pequeños fragmentos, incluso un único gen insertado en el propio genoma fágico, hasta secuencias más largas (cercasas a 100 kb), o a la totalidad de la cápside llena de ADN bacteriano. Por ese motivo, ciertos EGMs como plásmidos, transposones o islas de patogenicidad pueden empaquetarse parcialmente o en su totalidad dentro de la cápside de un fago (Mann & Slauch, 1997; Martínez-Rubio et al., 2017; Muniesa et al., 2013; Rodríguez-Rubio et al., 2020). Tanto es así, que algunos EGMs, como las islas de patogenicidad en *S. aureus* (SaPIs) parasitan cápsides de fagos para poder movilizarse (Penadés & Christie, 2015).

Se han descrito tres mecanismos de transducción: transducción generalizada, transducción especializada, y más recientemente, la transducción lateral (Fig. 7).

Transducción generalizada: Tiene lugar cuando únicamente se empaqueta ADN bacteriano (cromosómico o plasmídico) en lugar de ADN fágico. Las partículas fágicas que contienen ADN bacteriano se denominan **partículas transductantes**, y a través de ellas cualquier gen del genoma bacteriano puede ser empaquetado y transferido a otro huésped (Penadés et al., 2015). La transducción generalizada se produce durante el ciclo lítico del fago, tanto en fagos virulentos durante su replicación como en los atemperados tras inducir el ciclo lítico (Thierauf et al., 2009). Se han descrito varios fagos que son capaces de llevar a cabo la transducción generalizada, como los fagos P1, T1, T4, Mu o P22, que infectan a diversas especies de

enterobacterias, aunque también se han descrito en otros géneros y especies (Thierauf et al., 2009).

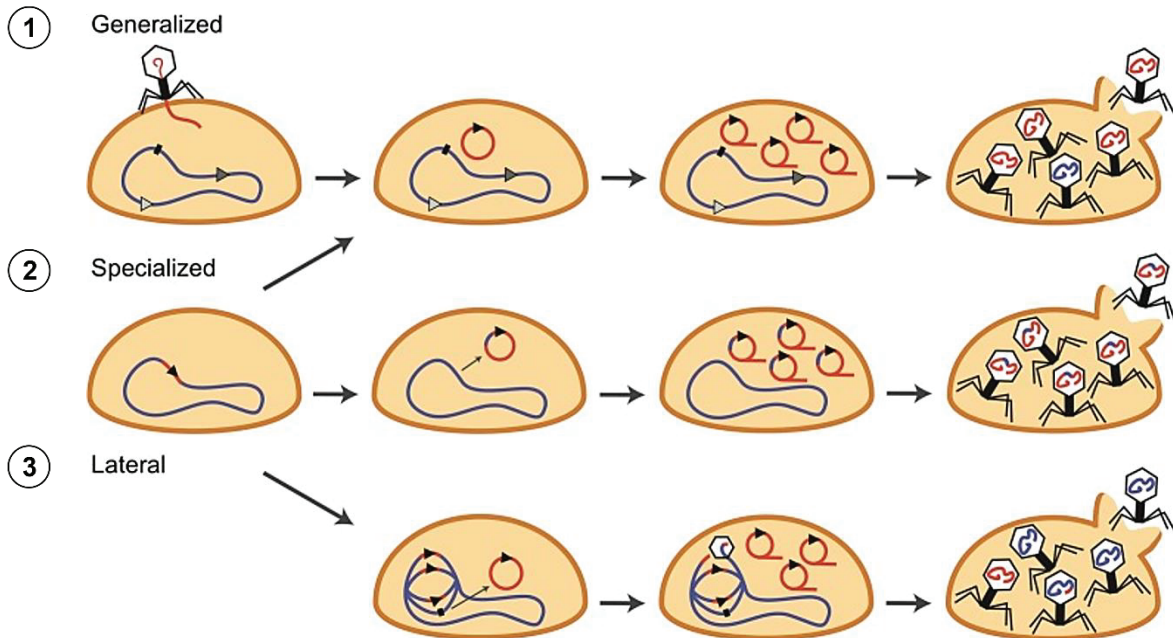


Figura 7. Transducción generalizada (1), especializada (2) y lateral (3). La transducción ocurre cuando los bacteriófagos adquieren genes del huésped o bacteria donadora, que son transferidos a otras bacterias receptoras. En la transducción generalizada, el genoma fágico (rojo) se replica y alguna cápside además puede empaquetar ADN bacteriano (azul). En la transducción especializada, durante la escisión el profago puede arrastrar un fragmento de ADN bacteriano (azul) que se replicará juntamente con el fago y se transducirá a otros huéspedes tras una nueva infección. En la transducción lateral, la replicación del fago tiene lugar antes de la escisión, produciéndose el empaquetamiento del genoma fágico (rojo) y a continuación de fragmentos del mismo tamaño del genoma bacteriano (azul) en las cápsidas previamente generadas. Imagen adaptada de Chiang et al., 2019.

El proceso de transducción generalizada puede explicarse siguiendo el modelo del fago P22, un fago atemperado que infecta a *Salmonella*. Tras la translocación del ADN fágico al citoplasma de la cepa huésped, el ADN bicatenario (lineal) del fago circulariza por recombinación. Durante el ciclo lítico, el genoma circularizado del fago inicia una replicación bidireccional antes de cambiar a una replicación en círculo rodante que genera concatómeros de doble cadena de ADN. En este punto, el fago codifica una terminasa fágica, que reconoce una secuencia específica en el ADN fágico, el sitio *pac*, que indica el lugar de corte del ADN fágico, cortando el ADN e iniciando la encapsidación del ADN en la cápside fágica hasta completar la capacidad de llenado. Cuando se completa el empaquetamiento, el ADN sobrante es escindido y transferido a una nueva cápside vacía para proceder a su llenado. Este proceso de escisión y empaquetamiento continúa hasta que varias cápsidas han sido

rellenadas con el ADN fágico (mecanismo de llenado de cabeza), y tras la maduración de los viriones se produce su liberación (Thierauf et al., 2009). En la transducción generalizada lo que ocurre es que las terminasas del fago reconocen sitios *pseudo-pac* (homólogos del sitio *pac*) presentes en el ADN cromosómico bacteriano. Cuando el fago infecta una cepa, las terminasas cortan en uno o más sitios *pseudo-pac*, empaquetando el ADN bacteriano en las cápsides fágicas en vez de ADN fágico, generando partículas transducentes que sólo contendrían ADN bacteriano, y mediante las cuales el ADN bacteriano podrá ser transferido una nueva cepa (Chiang et al., 2019; Thierauf et al., 2009). Al no contener genes fágicos, las partículas transducentes son incapaces de propagar ya que no tienen la información para llevar a cabo su replicación. Sin embargo, sí que son capaces de infectar a la cepa huésped e inyectar el ADN que contienen (ADN bacteriano). Una vez introducido, el ADN puede llegar a incorporarse en el cromosoma bacteriano mediante mecanismos de recombinación (Olson, 2014) o ser eliminado por diversos mecanismos de defensa de la cepa receptora, como los sistemas de modificación/restricción, CRISPR/Cas, etc. (Barrangou et al., 2007; Dupuis et al., 2013; Labrie et al., 2010). Además, los sitios *pseudo-pac* están distribuidos desigualmente por todo el cromosoma bacteriano, haciendo posible que la transducción generalizada pueda ocurrir en diferentes regiones del genoma bacteriano (Chiang et al., 2019).

Transducción especializada: Tiene lugar mediante fagos atemperados. Se produce como resultado de una escisión errónea de un profago insertado en el cromosoma bacteriano, empaquetando en una única cápside fágica el material genético fágico (parcial o total) y un fragmento de ADN cromosómico bacteriano adyacente al lugar de inserción del profago (Thierauf et al., 2009). Dentro de este tipo de transducción, también se considera cuando se transporta un fragmento específico de ADN bacteriano dentro del genoma fágico, aunque este fragmento no sea adyacente al profago, como es el caso de los fagos *Stx* (Imamovic et al., 2009).

Una vez que la partícula fágica es liberada puede infectar una nueva cepa huésped, y al integrarse como nuevo profago en el cromosoma bacteriano, también se integrará el fragmento de ADN bacteriano localizado en el genoma del fago. A diferencia de la transducción generalizada, estas partículas son fagos completos que contienen todos los genes fágicos y pueden replicarse, por lo que podrían volver a inducirse, generar nuevos viriones e infectar y propagar en nuevos huéspedes. Además, la frecuencia de la transducción especializada de un fragmento específico de ADN bacteriano es alta, debido a que todos los fagos que se generan a partir de ese profago contienen ese fragmento, por lo que aumentan las probabilidades de transferirlo (Fortier & Sekulovic, 2013).

Transducción lateral: Es un nuevo mecanismo de transducción (de elevada eficiencia) descrito en fagos de *S. aureus* y *Salmonella*, que es capaz de movilizar grandes fragmentos del cromosoma bacteriano (Chen et al., 2018; Filloi-Salom et al., 2021) (Fig. 8). Este mecanismo se ha descrito en fagos atemperados, y se basa en que la fase de replicación fágica comienza antes de la escisión del profago del cromosoma bacteriano, generándose diversas copias del profago cuando todavía están insertadas en el cromosoma bacteriano. Como resultado, el ADN fágico comienza a transcribirse dando lugar a las cápsides mientras todavía está insertado. Cada cápside se rellena con el ADN del profago por el sistema de llenado de cabeza. Inicialmente la terminasa produce un primer corte en una región cercana a la secuencia de reconocimiento específica (*pac*), pero es el volumen disponible en el interior de la cápside, y no la siguiente secuencia *pac*, la que determinará los siguientes puntos de corte de la terminasa. Como el profago no se ha escindido del cromosoma bacteriano, se continuará empaquetando el ADN adyacente al profago (ADN bacteriano) llenando la siguiente cápside. Una vez formada, se sigue con el siguiente fragmento bacteriano, que de nuevo se empaqueta, y así se continúan generando numerosas partículas fágicas transductantes llenas de fragmentos de la misma longitud de ADN bacteriano, localizados aguas abajo del lugar de inserción del profago. En la transducción lateral, el ADN bacteriano se empaqueta con una alta frecuencia (1000 veces superior a la de la generalizada), y se pueden llegar a empaquetar en cápsides fágicas largos fragmentos del cromosoma bacteriano (Chen et al., 2018). Este nuevo mecanismo puede tener una elevada implicación en el intercambio genético bacteriano, y considerando que diversas especies bacterianas poseen numerosos profagos en distintas localizaciones de su genoma (Ramisetty & Sudhakari, 2019), sería plausible que la transducción lateral también ocurra en otras especies, además de las ya descritas, y que mediante transducción lateral las bacterias pudieran movilizar grandes cantidades de su cromosoma o incluso su totalidad.

Una de las principales ventajas de la transducción es que no es necesario un contacto célula-célula cercano, sino que el material genético puede transferirse sin que la célula donadora y la receptora estén en el mismo espacio físico, ya que los fagos actúan de vehículos en el medio extracelular (Muniesa et al., 2013). Las características estructurales de los bacteriófagos les proporcionan una persistencia muy elevada a factores ambientales (temperatura, radiaciones, etc.), en muchos casos superior a la de sus huéspedes. Así, la cápside actúa como un escudo que protege al ADN empaquetado en su interior, propiciando que el ADN pueda permanecer íntegro durante más tiempo en el medio extracelular, favoreciendo sus posibilidades de ser transferido (Muniesa et al., 2013).

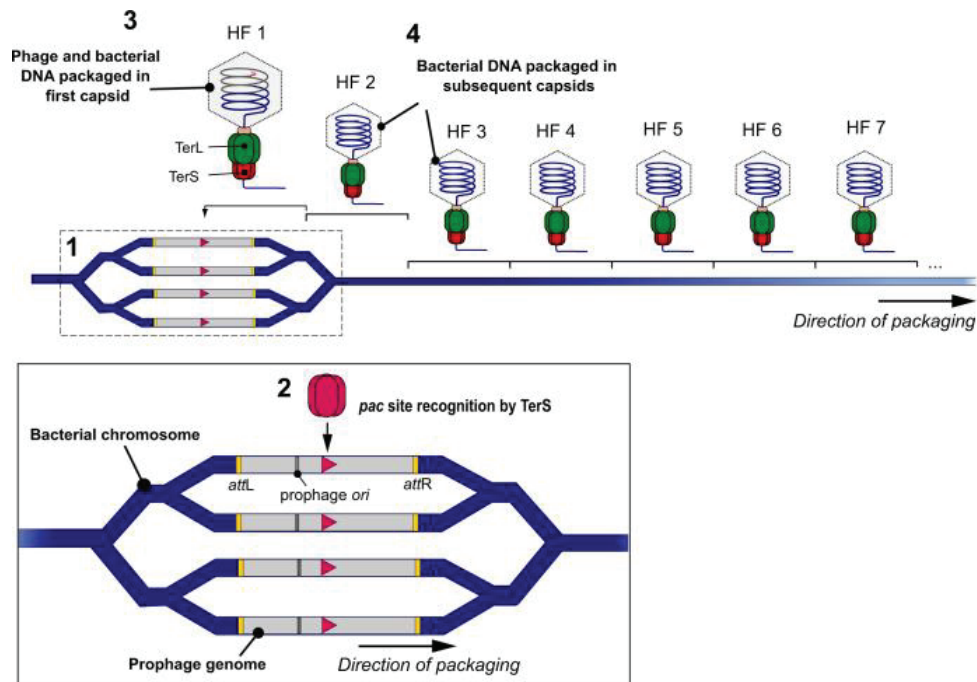


Figura 8. Transducción lateral (Humphrey et al., 2021). Se inicia cuando el profago todavía permanece integrado en el cromosoma bacteriano. **1.** El mecanismo comienza con la replicación bidireccional in situ del profago, generando múltiples copias del fago integrado y el genoma bacteriano adyacente. **2.** Algunos profagos se escinden del cromosoma bacteriano e inician el ciclo lítico, mientras que en los que permanecen todavía integrados la subunidad pequeña de la terminasa del fago (TerS) reconoce el sitio *pac* integrado (triángulo rosa) dentro del profago, y forma un complejo con la subunidad grande de la terminasa (TerL). **3.** Este complejo TerS-ADN se asocia con la TerL, que escinde y transloca el ADN a las cápsidas fágicas disponibles hasta llenarlas, empaquetándose en la primera ADN fágico y bacteriano. **4.** Cuando la cápside está llena, el ADN se escinde una vez más y el complejo Terminasa:ADN los transfiere a una cápside vacía, empaquetando ADN bacteriano en las sucesivas cápsides.

1.5. Implicaciones de la interacción bacteriófago-huésped

1.5.1. Regulación de poblaciones

Las interacciones entre bacteriófagos y sus huéspedes en muchas ocasiones va más allá de una relación meramente parasitaria, donde el fago utiliza la célula huésped para replicarse y originar nueva progenie. No obstante, la lisis celular causada por los fagos puede tener ciertas implicaciones en los diferentes biomas. En biomas naturales, como los ambientes oceánicos, son uno de los principales responsables de la degradación microbiana, estimándose que alrededor de un 10-50% de la mortalidad microbiana se debe a la lisis celular (Weinbauer, 2004). La capacidad lítica está influenciada por factores como la radiación solar o la temperatura, aunque principalmente depende de la disponibilidad de huéspedes, teniendo una mayor repercusión en los huéspedes más abundantes y activos, reforzando la cohabitación

de los diversos microorganismos siguiendo la estrategia de “matar al ganador (*kill the winner*)” para prevenir la predominancia de especies (Sime-Ngando, 2014). A través de la depredación y lisis de sus huéspedes, los virus son capaces de regular las comunidades microbianas. La lisis bacteriana causada por fagos libera al medio nutrientes, de manera directa (materia orgánica y otros elementos) o indirecta (mineralización o fotodegradación de la materia orgánica) (Weinbauer, 2004) lo que afecta (directa o indirectamente) a los ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrógeno, fósforo...) de estos ecosistemas, y además esta materia orgánica liberada pasa a ser utilizada como sustrato por otros microorganismos (Fuhrman, 1999; Heinrichs et al., 2020), contribuyendo a la cadena trófica de los ecosistemas.

Una situación parecida a los ecosistemas marinos ocurre en los terrestres. Las partículas virales del suelo, a través de la lisis celular, incrementan la concentración de carbono biodisponible y con ello la tasa respiratoria microbiana y su multiplicación en los suelos, además de influir en el ciclo del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo (Williamson et al., 2017).

En el cuerpo humano la elevada presencia de bacteriófagos también afecta a la regulación de la microbiota. Los fagos pueden estar implicados en la disbiosis bacteriana al eliminar poblaciones bacterianas, lo que a su vez podría tener cierto impacto en la salud humana (Navarro & Muniesa, 2017). Del mismo modo que en la microbiota intestinal humana, los fagos afectan a la microbiota animal. El ejemplo más estudiado es el rumen, donde se ha visto que mediante la lisis bacteriana se liberan restos celulares y material genético que puede ser captado por otras bacterias del rumen (Hartinger et al., 2018), lo que también favorece el intercambio genético bacteriano mediante la transferencia de genes metabólicos auxiliares que propician una reprogramación metabólica de la microbiota del rumen (Anderson et al., 2017).

1.5.2. Interacción con el sistema inmunológico

El sistema inmune tanto de humanos como de animales es capaz de generar, de forma natural, anticuerpos contra antígenos fágicos, predominando el isotipo IgM, aunque también se han detectado IgG e IgA (Majewska et al., 2019), y su presencia en suero se ha asociado a la ubicuidad de los fagos en el cuerpo humano y animal (Navarro & Muniesa, 2017).

Los bacteriófagos pueden, por un lado, incentivar la fagocitosis de sus huéspedes (Popescu et al., 2021), actuando como opsoninas (moléculas coadyuvantes de la fagocitosis) que hacen que las bacterias sean más reconocibles por las células del sistema inmune (van Belleghem et al., 2018). Por otro lado, y contradictoriamente, pueden inhibir la fagocitosis de sus huéspedes (Popescu et al., 2021) reduciendo la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de las células inmunitarias (Miedzybrodzki et al., 2008; Przerwa et al., 2006), o

influyendo en la capacidad de producir y activar la respuesta de ciertas citoquinas. Un ejemplo se encuentra en la interacción entre el bacteriófago Pf y su huésped *P. aeruginosa*, que le permite a la bacteria esquivar al sistema inmune ya que el fago Pf desencadena una respuesta antiviral que suprime la inmunidad contra la infección bacteriana (Sweere et al., 2019).

Los fagos también pueden interactuar indirectamente sobre la inmunidad humana y animal, como ocurre tras la acumulación de fagos en las capas mucosas (intestinal, pulmonar, etc.), impidiendo la adhesión y colonización de la mucosa por parte de sus huéspedes bacterianos (van Belleghem et al., 2018). Los fagos son capaces de interactuar con las células epiteliales, y esto puede derivar en una transcitosis que permite a los fagos atravesar la barrera epitelial y ser capaz de translocar a otros órganos, lo que explicaría la ubicuidad de los fagos en diferentes tejidos humanos y animales (Brown-Jaque et al., 2016; Łusiak-Szelachowska et al., 2017; Nguyen et al., 2017), como también veremos en esta tesis.

1.5.3. Conversión lisogénica: beneficios para la bacteria huésped

La interacción fago-huésped, a través de la transducción, desempeña un papel importante en la evolución bacteriana, al proporcionar al huésped nuevos genes que pueden facilitar su desarrollo y adaptación a factores ambientales y otorgar ventajas competitivas frente a otras bacterias (más detallado en el apartado **1.5.3.1**). Tal como se ha comentado anteriormente, el fenómeno por el cual una célula huésped lisogenizada altera su fenotipo debido a la expresión de genes codificados por el fago que porta se denomina **conversión lisogénica**.

En ecosistemas marinos, uno de los ejemplos más estudiados de transferencia genética entre fagos y sus huéspedes es el de las cianobacterias y los cianofagos. La eficacia de la replicación de cianofagos es dependiente de la actividad fotosintética y ésta disminuye durante el proceso de infección. Algunos cianofagos codifican genes implicados en procesos fotosintéticos, y durante la infección la expresión de estos genes potencia la actividad fotosintética, proporcionando a las cianobacterias energía y carbono, favoreciendo con ello la eficacia de la replicación de los cianofagos (Alperovitch-Lavy et al., 2011; Sullivan et al., 2006). En suelos contaminados con metales pesados, se ha visto que la interacción fago-huésped evoluciona desde una relación más parasitaria (propagación y lisis) a una relación más simbiótica, donde se prioriza la lisogenia, ya que su integración en el cromosoma bacteriano permite la expresión de genes que proporcionan ventajas adaptativas a su huésped frente a los altos niveles de toxicidad ambiental (Huang et al., 2021).

Algunos profagos contienen genes que codifican toxinas y otras proteínas relacionadas con la virulencia bacteriana. Por ejemplo, en las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga, el

operon *stx*, a partir del cual se expresa la toxina, está codificado en un profago (Fang et al., 2017). Una inducción espontánea o mediada por agentes físicos o químicos puede desencadenar el ciclo lítico del profago, cuya replicación produce un aumento en la expresión de la toxina Shiga y que además genera una progenie vírica portadora de los genes *stx*, que pueden ser transducidos a otras cepas bacterianas (Rodríguez-Rubio et al., 2021).

También se han visto profagos que codifican toxinas en *Vibrio cholerae*, patógeno humano capaz de colonizar el intestino delgado y provocar diarreas graves debido a la expresión de la toxina colérica (CTX), codificada por un profago (CTX ϕ) (Castillo et al., 2018; Waldor & Mekalanos, 1996).

Las neurotoxinas botulínicas, producidas por *Clostridium botulinum*, son una de las toxinas más potentes que existen y el agente causal del botulismo, comúnmente asociado al consumo de alimentos contaminados con estas toxinas. Se han descrito 7 grupos de toxinas botulínicas, A, B, C1, D, E, F, G, de las cuales C1 y D están codificadas por profagos (Sakaguchi et al., 2005). *Clostridioides difficile* (anteriormente conocido como *Clostridium difficile*) también cuenta con un profago (ϕ Semix9P1) que contiene un locus de una toxina (Riedel et al., 2017).

Corynebacterium diphtheriae es el agente causal de la difteria, enfermedad producida tras la secreción de la toxina diftérica, cuyos genes (*tox*) están codificados en corinefagos atemperados, y sólo las cepas que contienen estos profagos secretan la toxina y producen la enfermedad (Holmes, 2000).

S. aureus presenta diferentes ejemplos de factores de virulencia codificados por fagos u otros EGMs relacionados con fagos, como la toxina que causa la enfermedad del síndrome del shock tóxico, localizada en una isla de patogenicidad de *S. aureus* (SaPI-1), la enterotoxina A, que causa una intoxicación alimentaria, o la toxina exfoliativa, agente causal del síndrome de la piel escaldada (Yamaguchi et al., 2000; Zeaki et al., 2015).

Además de toxinas, algunos fagos también codifican otros factores de virulencia que contribuyen a la adhesión y colonización bacteriana, así como a la formación de biofilms (Popescu et al., 2021).

1.5.3.1. Bacteriófagos portadores de GRAs

El papel de los bacteriófagos en la movilización de GRAs está cogiendo fuerza en los últimos años y está siendo considerado como un importante contribuyente en la emergencia de nuevas cepas resistentes (Balcázar, 2020). A pesar de que la transducción se había considerado como un evento poco relevante, se ha demostrado que sucede a frecuencias mucho más elevadas de las que se pensaba (Kenzaka et al., 2010), hecho que, sumado al descubrimiento de la transducción lateral, y su elevada frecuencia de transducción, evidencia

su importancia en la movilización genética. A nivel de laboratorio, se ha reportado la transducción de algunos GRAs, resistencias a tetraciclinas entre enterococos, β -lactamasas en *E. coli* y múltiples resistencias entre diversas cepas de *S. pyogenes* (Billard-Pomares et al., 2014; Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011; Ubukata et al., 1975).

La elevada presión selectiva a la que están sometidas muchas poblaciones bacterianas por la constante presencia de antibióticos incentiva la movilización y adquisición de resistencias, también las localizadas en fagos. Un estudio realizado en ratones tras someterlos a un tratamiento con antibióticos observó un aumento de GRAs en la fracción de ADN fágico que conferían resistencia a los antibióticos administrados, y que este tratamiento incentivaba la interacción entre fagos y huéspedes, potenciando el intercambio genético entre ellos (Modi et al., 2013). En otro estudio, cepas de *E. coli* sensibles a ampicilina se volvieron resistentes tras la transfección de genes de resistencia a β -lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}) detectados en bacteriófagos procedentes de aguas residuales (Colomer-Lluch et al., 2011a).

La capacidad de los fagos para movilizar GRAs, confirmada en el laboratorio, junto a su enorme diversidad y ubicuidad hace plausible que los eventos de transducción de GRAs puedan ocurrir también en las poblaciones naturales, estimulado por el uso de antibióticos y la emisión de sus residuos al medio ambiente.

1.6. Resistoma en los viomas ambientales, humanos y animales

Se conoce como **resistoma** al conjunto de todos los GRAs y sus precursores (*protoresistance genes*) presentes en el conjunto de microorganismos patógenos y no patógenos. Los resistomas pueden clasificarse según su vinculación a un antibiótico en concreto (genes que confieren resistencia a tetraciclina), atendiendo a su localización (el resistoma del suelo, de ambientes marinos, humano, etc.), o el resistoma de un organismo a nivel individual (Hobson et al., 2021).

El estudio de los resistomas nos permite evaluar el impacto de la transmisión de GRAs entre los diversos ecosistemas (Kim & Cha, 2021) (Fig. 9). Además, las nuevas herramientas de secuenciación masiva han permitido realizar un análisis en mayor profundidad de la diversidad de GRAs y sus huéspedes, arrojando luz sobre los mecanismos de transmisión de GRAs entre diferentes biomas, especialmente relevantes en ambientes naturales con una altísima diversidad microbiana.

Como se ha comentado anteriormente, diversos EGMs están involucrados en la movilidad del resistoma. Mientras que existen numerosos estudios sobre el papel de los plásmidos (Dolejska et al., 2011; Galimand et al., 2003; Lancashire et al., 2005; Rozwandowicz et al.,

2018; Wu et al., 2018; Wu, Dalsgaard, et al., 2010), el papel de los fagos en la dispersión de resistencias todavía no está bien establecido. Sin embargo, diversos estudios de nuestro grupo de investigación y de otros autores han demostrado la abundancia de los fagos o partículas fágicas que contienen GRAs en biomas ambientales, humanos y animales (Tabla 2).

Tabla 2. GRAs detectados en la fracción viral en biomas ambientales, humanos y animales con anterioridad a esta tesis. Tabla adaptada de Jebri et al., 2021.

Fuente	GRAs	Antibióticos	Referencia
Agua residual humana	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>mecA</i> <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i>	β-lactámicos Quinolonas	(Colomer-Lluch et al., 2011a, 2014a; Muniesa et al., 2004; Roshini & Karunasagar, 2017)
Agua residual hospitalaria	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{SHV} <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> , <i>qnrB</i>	β-lactámicos Quinolonas	(Marti et al., 2014)
Agua de río	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{NDM} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> , <i>sul1</i> <i>vanA</i> <i>ermB</i> <i>tetW</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Glicopéptidos Macrólidos Tetraciclinas	(Calero-Cáceres et al., 2017; Lekunberri et al., 2017a)
Agua regenerada	<i>bla</i> _{TEM} <i>qnrA</i> <i>sul1</i> <i>vanA</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Vancomicina	(Garner et al., 2018)
Lodos depuradora	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M} <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> <i>sul1</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas	(Calero-Cáceres et al., 2014)
Suelos agrícolas	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> <i>sul1</i> <i>arma</i> <i>tetW</i> , <i>tetX</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Aminoglucósidos Tetraciclinas	(Larrañaga et al., 2018; McKinney et al., 2018)
Heces humanas	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> <i>sul1</i> <i>arma</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Aminoglucósidos	(Brown-Jaque et al., 2018a; Quirós et al., 2014)
Espitos fibrosis quística	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i>	β-lactámicos Quinolonas	(Brown-Jaque et al., 2018b)
Heces cerdo	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> <i>sul1</i> <i>ermB</i> <i>tetM</i> <i>fexA</i> <i>floR</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Macrólidos Tetraciclinas Cloranfenicol florfenicol	(Wang et al., 2018)
Agua residual granjas	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i>	β-lactámicos Quinolonas	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
Suelo granjas	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{OXA-2} <i>tetA</i> , <i>tetW</i>	β-lactámicos Tetraciclinas	(Anand et al., 2016)
Vegetales	<i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{CTX-M-1} <i>bla</i> _{CTX-M-9} <i>bla</i> _{VIM} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>mecA</i> <i>qnrS</i> , <i>qnrA</i> , <i>sul1</i> <i>arma</i>	β-lactámicos Quinolonas Sulfonamidas Aminoglucósidos	(Larrañaga et al., 2018)

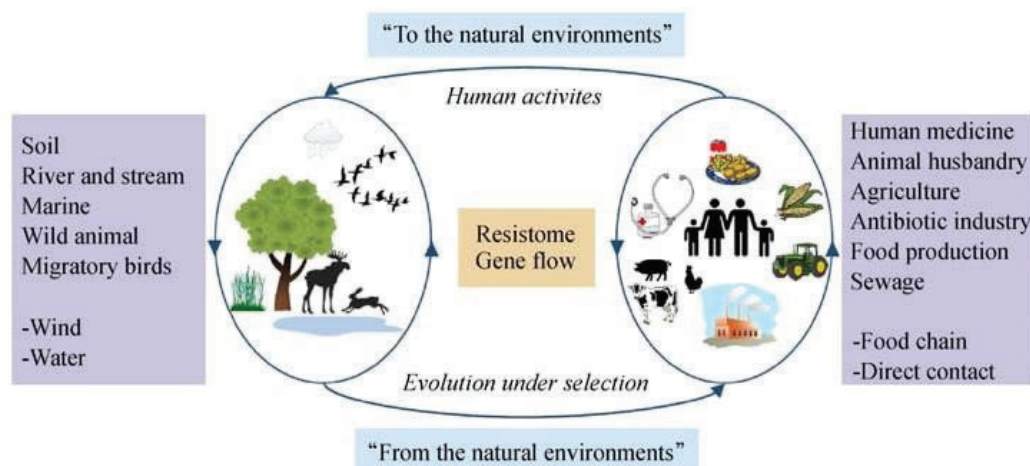


Figura 9. Resistomas y flujo de GRAs entre biomas ambientales, humanos y animales (Hu et al., 2017)

1.6.1. Resistoma ambiental

Prácticamente todos los biomas ambientales son considerados una fuente de GRAs (Cuadrat et al., 2020).

El **suelo** es un medio difícil para los microorganismos y la competencia hace que muchos productores de antibióticos sean microorganismos del suelo. El suelo se ha identificado como un reservorio de antimicrobianos utilizados habitualmente en microbiología clínica y de las resistencias a los mismos (Forsberg et al., 2012; Martínez, 2008). Los GRAs de las poblaciones microbianas del suelo frente a algunos de los antibióticos más utilizados (β -lactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas) comparten gran homología con los de bacterias patógenas humanas (Forsberg et al., 2012) y, además, estos GRAs suelen estar flanqueados por secuencias correspondientes a EGMs (Forsberg et al., 2012). Los **suelos agrícolas**, con claro impacto antropogénico por el uso de abonos orgánicos procedentes de desechos animales o el uso de aguas regeneradas, constituyen una fuente de residuos de antibióticos y de GRAs que pueden ser reintroducidos en humanos y animales a través del consumo de vegetales cultivados en ellos (Qian et al., 2018). En los suelos, los bacteriófagos actúan como intermediarios en la adquisición de GRAs por parte de las bacterias. Al comparar los GRAs de la fracción bacteriana y vírica de suelos agrícolas, se observaron los mismos GRAs (Ross & Topp, 2015). Otro estudio demostró que los genes *bla*_{TEM} y *sul1* se encontraban a niveles elevados en el ADN viral en muestras de suelos (Larrañaga et al., 2018). En el mismo estudio se encontraron partículas fágicas con los mismos GRAs encontrados en vegetales aptos para su consumo, estableciendo el suelo como posible origen de los fagos con GRAs en los productos vegetales (Larrañaga et al., 2018).

En **ecosistemas marinos**, desde aguas costeras (con mayor impacto antropogénico (Coutinho et al., 2013), hasta aguas abiertas (con bajo impacto antropogénico) (Cuadrat et al., 2020), se ha encontrado una alta diversidad de GRAs y, se ha visto que muchos de ellos presentan homología con los detectados habitualmente en clínica (β -lactamasas, resistencia a tetraciclinas, etc) (Cuadrat et al., 2020; Hatosy & Martiny, 2015) y se localizan en elementos genéticos móviles (Cuadrat et al., 2020). Esto incluye a los fagos, como confirman los viromas de muestras oceánicas obtenidas de diferentes puntos (Calero-Cáceres & Balcázar, 2019) y que se tratará en uno de los capítulos de esta tesis (**Capítulo 4.5**).

Las **aguas residuales** son representativas del contenido fecal de un grupo numeroso de humanos o animales, y en ocasiones de ambos a la vez (Calero-Cáceres et al., 2014). En el resistoma de aguas residuales en diferentes estadios (entrada, efluente, lodos) se ha descrito que la mayoría de GRAs están localizados en EGMs (Che et al., 2019; Ju et al., 2019). La presencia de bacterias y fagos con GRAs en estos ambientes también es remarcable, coincidiendo, además, con GRAs de origen clínico como *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} o *qnr* (Colomer-Lluch et al., 2011a, 2014a).

1.6.2. Resistoma humano

Dentro de la microbiota humana, el resistoma intestinal es uno de los más estudiados y el que podría tener una mayor implicación en la transmisión de resistencias (Moore et al., 2013; Ravi et al., 2015; van Schaik, 2015). Los GRAs detectados en la microbiota comensal intestinal son los mismos que los detectados en los patógenos, lo que sugiere que mediante mecanismos de TGH estos GRAs pueden ser transferidos desde la microbiota intestinal a patógenos oportunistas (Sommer et al., 2009). Los bacteriófagos, como parte de la microbiota intestinal, pueden desempeñar un papel importante en la movilización de resistencias, como evidencia la detección de fagos con una gran diversidad de GRAs (de relevancia en clínica) en muestras fecales humanas (Brown-Jaque et al., 2018a; Quirós et al., 2014).

Además del tracto intestinal, la microbiota oral también contiene GRAs, y de nuevo en muchos casos localizados en EGMs (Sukumar et al., 2016). En el resistoma del sistema respiratorio destaca la presencia de genes que proporcionan resistencia a β -lactámicos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, tanto en individuos sanos como en pacientes con patologías respiratorias (Aogáin et al., 2020). Una elevada prevalencia de resistencias a β -lactámicos en la fracción viral de muestras de esputo obtenidas de pacientes con fibrosis quística (Brown-Jaque et al., 2018b), vuelve a evidenciar el potencial papel de los bacteriófagos en la movilización de GRAs en el cuerpo humano.

1.6.3. Resistoma animal

El uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales, como profilaxis y como promotores del crecimiento, han provocado una alteración en la microbiota de los animales y han influido en su resistoma, incentivando la selección de bacterias resistentes y la transmisión de resistencias estrechamente relacionada con el tipo de antibióticos administrados a estos animales (Munk et al., 2018). En el ADN fágico, *sul1* y *bla*_{TEM} han sido los GRAs más prevalentes en heces de cerdo (Wang et al., 2018) y *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9} y *mecA* en residuos fecales de ganado vacuno y de granjas avícolas y porcinas (Colomer-Lluch et al., 2011b).

Como se ha comentado anteriormente, el uso de antibióticos en acuicultura tiene un fuerte impacto en ambientes acuáticos (Cabello, 2006). Los residuos de antibióticos y GRAs se han detectado en sedimentos y efluentes de piscifactorías, con el consecuente riesgo de transferencia a las poblaciones naturales (Jo et al., 2021; Muziasari et al., 2017). Además, el resistoma intestinal de los peces de piscifactoría es el mayor contribuyente a la presencia de GRAs en los sedimentos de estas áreas (Muziasari et al., 2017).

También hay que considerar el impacto que puede generar sobre la fauna salvaje. El estudio del resistoma en diferentes especies terrestres y acuáticas de vida libre ha revelado que contenían GRAs con secuencias similares a los descritos en aislados clínicos de relevancia en salud pública, y en muchos casos asociados a EGMs, poniendo de manifiesto la conexión existente entre la fauna salvaje y el ser humano (Chen et al., 2020).

1.6.4. Resistencias en alimentos: importancia de la cadena alimentaria

Los alimentos pueden actuar como vectores de GRAs y de bacterias resistentes, siendo la cadena alimentaria una de las principales vías de conexión entre los biomas humano, animal y ambiental.

La presencia de bacterias resistentes y de GRAs en matrices alimentarias puede ocurrir en la propia materia prima o contaminarse a lo largo de las diferentes etapas de procesamiento del alimento (Fig. 10). La propia microbiota de las materias primas o la contaminación de éstas por el suelo, el agua utilizada para riego o la contaminación fecal directa (en granjas o mataderos), son los posibles orígenes. También es considerable la influencia de contaminación durante el transporte y almacenamiento alimentario e incluso en los propios hogares (Bergogne-Bérézin, 1997). Los productos contaminados pueden, a su vez, contribuir a la contaminación de las plantas de procesado, incluyendo los instrumentos y las superficies

utilizados en el procesamiento de los productos, así como los desechos generados (drenaje, aguas de limpieza, etc.) (Cobo-Díaz et al., 2021).

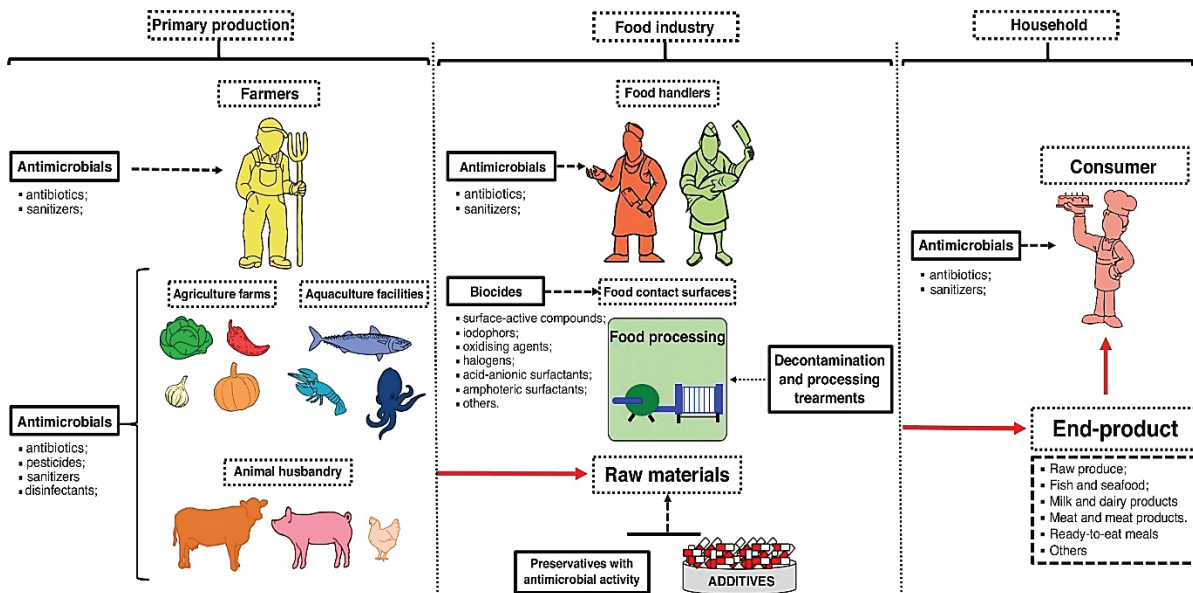


Figura 10. Fuentes de GRAs y transmisión de resistencias a través de la cadena alimentaria (Oniciuc et al., 2019).

Con el objetivo de alargar la vida útil del alimento y obtener productos seguros, muchos alimentos se someten a diferentes tratamientos, la mayoría destinados a la eliminación de microorganismos con potencial patógeno que pudieran encontrarse en los productos alimenticios. Sin embargo, algunos tratamientos bacteriostáticos pueden ser capaces de activar diversos mecanismos de respuesta microbianos, entre ellos la inducción de EGMS (incluidos fagos) o la expresión de genes de resistencia (Ganjian et al., 2012; McMahon et al., 2007a; McMahon et al., 2007b).

La ubicuidad de los bacteriófagos también los convierte en potenciales contaminantes de los productos alimenticios, y al igual que las bacterias pueden terminar en los alimentos a partir de las materias primas. Además, muchos de los tratamientos utilizados habitualmente en la desinfección de alimentos (irradiación con UV, uso de biocidas, cloración, tratamientos térmicos) tienen una menor eficacia contra los bacteriófagos (Calero-Cáceres & Muniesa, 2016), que mantendrían su capacidad infectiva, y en caso de fagos atemperados, podrían inducir su ciclo lítico.

No hay que olvidar que en los últimos años se ha incrementado el uso de bacteriófagos como agentes antimicrobianos en seguridad alimentaria, posicionándose como una alternativa ecológica al uso de químicos y antibióticos. Algunos cocteles de fagos han recibido la

presunción de seguridad en materia de biocontrol por la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA) (Endersen & Coffey, 2020; Kawacka et al., 2020). No obstante, el impacto que pueden tener los bacteriófagos en la transferencia de GRAs en productos alimenticios es un factor a considerar para su utilización como agentes de biocontrol (Koutsoumanis et al., 2021). La presencia de partículas fágicas portadoras de GRAs ya se ha reportado en vegetales, alimentos que habitualmente se consumen crudos o con un mínimo tratamiento, estableciéndolos como potenciales vehículos de GRAs a través de la dieta (Larrañaga et al., 2018).

El análisis de bacteriófagos portadores de GRAs en diversas matrices alimentarias es uno de los principales objetivos de esta tesis doctoral.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es estudiar la diversidad de bacteriófagos portadores de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) en biomas humanos, animales y ambientales, centrándonos en su presencia en alimentos, debido a que la cadena alimentaria constituye un nexo entre los distintos biomas. Además, se pretende identificar el origen de las partículas portadoras de GRAs y evaluar el papel de los bacteriófagos como potenciales vectores en la transmisión de resistencias.

A partir de este objetivo general se han planteado diferentes objetivos específicos que se detallan a continuación:

- Evaluar la presencia de partículas fágicas infecciosas portadoras de genes bacterianos (GRAs y *16S ARNr*) en diferentes fluidos humanos y observar su injerencia en el correcto diagnóstico microbiológico de patógenos. (*Capítulo 1*).
- Determinar la presencia de partículas fágicas infecciosas portadoras de genes bacterianos (GRAs y *16S ARNr*) en diversos grupos de alimentos: matrices cárnicas (carnes de ternera, cerdo, pollo y embutidos) (*Capítulo 2*), en productos lácteos (incluyendo una bebida vegetal) (*Capítulo 4*), pescados y mariscos (mediterráneos, atlánticos, pescado congelado, pescado de piscifactoría, mejillones y almejas) (*Capítulo 5*).
- Evaluar el potencial origen de partículas fágicas infecciosas portadoras de genes bacterianos (GRAs y *16S ARNr*). Para ello se analizaron viromas fecales de pollo (*Capítulos 2 y 3*) y viromas de hígados de pollo (*Capítulo 3*), a fin de verificar si las heces y el hígado pueden actuar como origen y reservorio de GRAs en partículas fágicas.
- Evaluar la influencia del impacto antropogénico en la presencia de bacteriófagos portadores de GRAs. Para ello se realizó un estudio comparativo entre un ambiente con bajo impacto humano, como son las aguas del océano Antártico, y un ambiente con un alto impacto antropogénico, como son las aguas de la costa mediterránea (*Capítulo 5*).

3. INFORMES

3.1. Informe sobre el factor de impacto

Los artículos que conforman la memoria de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas científicas internacionales registradas en el **Journal Citation Report** y son destacadas en su línea de investigación.

- El artículo “*Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples*” fue publicado el 21 de abril de 2020 en la revista *Scientific Reports* (DOI:10.1038/s41598-020-63432-7) que se encuentra en el primer cuartil (Q1) de su categoría (*Multidisciplinary Sciences*) con un factor de impacto en 2020 de 4,380.
- El artículo “*Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces*” fue publicado el 16 de septiembre de 2019 en la revista *Scientific Reports* (DOI: 10.1038/s41598-019-49898-0) que se encuentra en el primer cuartil (Q1) de su categoría (*Multidisciplinary Sciences*) con un factor de impacto en 2019 de 3,998.
- El artículo “*Chicken liver is a potential reservoir of bacteriophages and phage-derived particles containing antibiotic resistance genes*” fue publicado el 29 de abril de 2022 en la revista *Microbial Biotechnology* (DOI:10.1111/1751-7915.14056) que se encuentra en el primer cuartil (Q1) en sus dos categorías (*Biotechnology & Applied microbiology; Microbiology*) con un factor de impacto en 2022 de 6,575.
- El artículo “*Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a plant-based milk*” fue publicado el 20 de febrero de 2022 en la revista *International Journal of Food Microbiology* (DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590) que se encuentra en el primer cuartil (Q1) en la categoría de *Food Science & Technology* con un factor de impacto en 2022 de 5,911.
- El artículo “*Antibiotic resistances genes in phage particles from antarctic and mediterranean seawater ecosystems*” fue publicado el 24 de agosto de 2020 en la revista *Microorganisms* (DOI:10.3390/microorganisms8091293) que se encuentra en el segundo cuartil (Q2) de su categoría (*Microbiology*) con un factor de impacto en 2020 de 4,128.

MARIA TERESA
MUNIESA
PEREZ - DNI
43513183N

Firmado digitalmente por
MARIA TERESA
MUNIESA PEREZ -
DNI 43513183N
Fecha: 2022.09.05
13:18:11 +02'00'

Dra. M^a Teresa Muniesa Pérez

Dra. Lorena Rodríguez Rubio

Barcelona, septiembre de 2022

3.2 Informe de participación en las publicaciones

El doctorando Pedro Blanco Picazo ha participado en todas las publicaciones que forman parte de su tesis de la manera que se detalla a continuación. Ninguno de los coautores de los artículos ha utilizado los datos y las publicaciones para la elaboración de su tesis doctoral.

- **Blanco-Picazo, P.**, Fernández-Orth, D., Brown-Jaque, M., Miró, E., Espinal, P., Rodríguez-Rubio, L., Muniesa, M., y Navarro, F. (2020). Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Scientific reports*, 10(1), 1-10, 6737. DOI: 10.1038/s41598-020-63432-7. PMID: 32317653

El doctorando ha llevado a cabo los experimentos de reducción y eliminación de bacteriófagos y la recuperación bacteriana y su posterior recuento, y ha colaborado en la interpretación de resultados. Ha confeccionado tablas y figuras, y ha participado en la revisión del artículo.

- Gómez-Gómez, C., **Blanco-Picazo, P.**, Brown-Jaque, M., Quirós, P., Rodríguez-Rubio, L., Cerdà-Cuellar, M., & Muniesa, M. (2019). Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Scientific reports*, 9(1), 1-11, 13281. DOI: 10.1038/s41598-019-49898-0. PMID: 31527758

El doctorando ha participado en la obtención de las muestras de este estudio, la detección de genes de resistencia mediante qPCR y ha colaborado en el análisis de los resultados obtenidos y en la revisión del artículo.

- **Blanco-Picazo, P.**, Gómez-Gómez, C., Aguiló-Castillo, S., Fernández-Orth, D., Cerdà-Cuellar, M., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2022). Chicken liver is a potential reservoir of bacteriophages and phage-derived particles containing antibiotic resistance genes. *Microbial biotechnology*, 1-12, 10.1111/1751-7915.14056. DOI: 10.1111/1751-7915.14056. PMID: 35485188

El doctorando ha realizado gran parte del procesamiento y preparación de las muestras, la extracción de ADN fágico y su análisis mediante qPCR, la extracción de ADN fágico para los análisis metagenómicos y la preparación de muestras para el microscopio electrónico. También ha contribuido en el análisis de los resultados

obtenidos, ha confeccionado tablas y figuras, y ha participado activamente en la redacción del artículo y su revisión.

- **Blanco-Picazo, P.**, Gómez-Gómez, C., Morales-Cortes, S., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2022). Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a nut-based milk. *International journal of food microbiology*, 367, 1-8, 109590. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590. PMID: 35220008

El doctorando ha participado en la obtención y el procesamiento de las muestras. Ha realizado los experimentos de propagación, ha llevado a cabo la extracción de ADN fágico de estas muestras y su análisis mediante qPCR y ha realizado los análisis de microscopía electrónica. También ha contribuido en el análisis de los resultados obtenidos y en la confección de tablas y figuras, y ha participado activamente en la redacción del artículo y su revisión.

- **Blanco-Picazo, P.**, Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2020). Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles from Antarctic and Mediterranean Seawater Ecosystems. *Microorganisms*, 8(9), 1-15, 1293. DOI: 10.3390/microorganisms8091293. PMID: 32847015

El doctorando ha participado en la obtención y el procesamiento de las muestras de aguas mediterráneas, pescados y mariscos. Ha realizado los experimentos de propagación, ha llevado a cabo la extracción de ADN fágico de estas muestras y su análisis mediante qPCR. También ha contribuido en el análisis de los resultados obtenidos, ha confeccionado tablas y figuras, y ha participado activamente en la redacción del artículo y su revisión.

MARIA TERESA
MUNIESA
PEREZ - DNI
43513183N

Firmado digitalmente
por MARIA TERESA
MUNIESA PEREZ - DNI
43513183N
Fecha: 2022.09.05
13:18:33 +02'00'

Dra. M^a Teresa Muniesa Pérez

Dra. Lorena Rodríguez Rubio

Barcelona, septiembre de 2022

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo 1:

Descifrando las consecuencias de los bacteriófagos en muestras humanas

Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples

Pedro Blanco-Picazo, Dietmar-Fernández-Orth, Maryury Brown-Jaque, Elisenda Miró, Paula Espinal, Lorena Rodríguez-Rubio, Maite Muniesa y Ferran Navarro

Scientific Reports (2020); 10(1), 1–10.

DOI: 10.1038/s41598-020-63432-7

Introducción

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan bacterias y son considerados las entidades biológicas más abundantes del planeta. Los bacteriófagos regulan las comunidades bacterianas (Letarov & Kulikov, 2009; Winter et al., 2004) y contribuyen a la variabilidad bacteriana mediante la transducción (Thierauf et al., 2009)

La presencia de bacteriófagos en muestras humanas puede provocar problemas de contaminación en cultivos de laboratorio, dando lugar a errores en la interpretación de resultados y a una incorrecta detección del patógeno (Brown-Jaque et al., 2016). Esta interferencia es visible a dos niveles: 1) los bacteriófagos pueden propagar en cultivos líquidos de enriquecimiento, infectando a la bacteria y provocando su lisis, por lo que no se la podría detectar y 2) los bacteriófagos son capaces de transportar ADN bacteriano, incluyendo toxinas, genes de resistencia a antibióticos (GRAs) o el gen *16S ARNr* que, al analizarse mediante métodos moleculares, pueden confundirse con la presencia del patógeno.

Para frenar este problema, en este estudio se ha propuesto un método que consigue la reducción del número de partículas fágicas sin afectar al recuento bacteriano.

Objetivos

Verificar la presencia de partículas fágicas infecciosas en muestras humanas y si estas partículas contienen genes bacterianos, como GRAs y *16S ARNr*, que puedan interferir en el correcto diagnóstico microbiológico. Este estudio se propone como objetivo el desarrollo de un método eficaz que permita eliminar el mayor número de bacteriófagos de una muestra sin interferir en el recuento final bacteriano, reduciendo tiempos, esfuerzos y costes.

Resultados y discusión

Con el objetivo de determinar la presencia de bacteriófagos en fluidos humanos, se analizaron muestras de líquido ascítico, sangre, suero, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR). Se detectaron fagos en todas las matrices analizadas (Tabla 1) y en algunos casos fagos capaces de infectar la cepa huésped *E. coli* WG5.

Entre un 40-57% de las muestras analizadas mostraron bacteriófagos infecciosos, con la excepción de las muestras de sangre (sólo un 13,5%). Éstos fueron además detectados por microscopía electrónica, aunque el porcentaje de muestras positivas fue ligeramente inferior (Tabla 1), probablemente debido al número mínimo de partículas requeridas para su visualización (10^7 - 10^8 partículas fágicas/ml).

Las muestras de líquido ascítico fueron las que presentaron los porcentajes más altos de bacteriófagos (45%), atribuibles a la translocación de bacterias y/o fagos que ocurre desde el tracto digestivo al fluido peritoneal. Tras éstas, el suero (28% de positivos), orina (22%), LCR (14%) y finalmente sangre (11%). La presencia de bacteriófagos en el LCR no era esperable debido a que los fagos tendrían que atravesar la barrera de las meninges y, además, esta zona está alejada de las regiones más contaminadas desde donde se podrían translocar. Hasta la fecha, no se habían reportado fagos infecciosos en LCR en muestras de origen humano, aunque sí se ha descrito la presencia de *contigs* asociados a fagos en este tipo de muestra (Pou et al., 2018). En el caso de la orina, también considerada estéril, la presencia de fagos se puede deber a una contaminación por la microbiota de la uretra distal, de la vagina o del perineo durante la recogida de las muestras, pudiendo llegar a interferir en el correcto análisis microbiológico. Finalmente, una posible explicación del menor porcentaje de positivos en muestras de sangre podría ser que este tipo de muestras se diluyeron en frascos para hemocultivo, y que su manipulación conlleva una mayor dificultad (sobre todo en la filtración), dando lugar a una inactivación de los fagos infecciosos y dificultando su visualización por microscopía electrónica.

La observación de las partículas fágicas por microscopía electrónica confirmó la presencia de fagos del tipo *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Inoviridae* (Fig. 1), estos últimos sólo en LCR. Coincidiendo con trabajos previos, los fagos del tipo *Siphoviridae* fueron los más representativos (Brown-Jaque et al., 2016; Fernández-Orth et al., 2019).

La generación de librerías requiere una concentración y pureza mínimas de ADN, y considerando el complejo proceso de purificación y extracción de ADN fágico, que garantice que sólo se analiza el ADN contenido en las cápsides fágicas (Fernández-Orth et al., 2019), sólo se consiguió reunir una cantidad suficiente de pureza y concentración de ADN en 4 homogenados de orina y 1 homogenado de líquido ascítico. Además, para verificar que el

ADN analizado era ADN empaquetado dentro de las cápsides fágicas, se realizó el análisis por qPCR del gen *16S ARNr* antes de romper las cápsides, confirmando la ausencia de ADN no empaquetado y la eficacia del método (Fernández-Orth et al., 2019).

En el análisis del viroma se detectaron muchas secuencias que no pudieron ser clasificadas. A pesar de ello, se confirmó la presencia de ADN fágico en las muestras, encontrando coincidencias con fagos que infectan a diversos géneros bacterianos (Tabla 2, Fig. 2). Además, en los 5 viromas analizados se detectó un rango mucho más amplio de fagos y de posibles huéspedes que en estudios previos (Fernández-Orth et al., 2019), destacando entre ellos la detección de fagos que infectan a *Propionibacterium* y *Staphylococcus* en todas las muestras, así como la presencia de *CrAssphage*, un fago específico de humanos que infecta a bacterias del género *Bacteroides*. También se detectaron fagos que infectan a bacterias ambientales, algo inesperado al analizarse muestras humanas, aunque existen estudios que confirman la detección de bacterias marinas o patógenos de plantas en intestinos, orina y ascítico de metagenomas humanos (Chen, Guo, et al., 2018; Ezzat et al., 2014; Morand et al., 2019; Nam et al., 2011; Suzuki & Worobey, 2014), pudiendo ser adquiridos a través de la dieta, por contaminación cruzada entre diferentes biomas humanos (orina-fecal, ascítico-fecal) o por similitud de secuencias con otros fagos.

En los viromas analizados también se detectaron una gran diversidad de secuencias de genes del 16S ARNr pertenecientes a diferentes géneros bacterianos (Tabla 3, Fig. 2), coincidiendo algunos de estos géneros con los posibles huéspedes de los bacteriófagos presentes en las muestras (Fig. 2). Además, se observó que el número de secuencias del 16S ARNr en partículas fágicas excedía con creces al de fagos identificados (Fig. 2), aunque este hecho podría tener su explicación en el elevado número de secuencias del 16S ARNr presentes en las bases de datos en comparación con secuencias fágicas. Se descartó que la elevada detección de secuencias bacterianas en los viromas fuera fruto de una contaminación con ADN bacteriano exógeno, ya que se analizó la presencia del gen *16S ARNr* por qPCR antes del proceso de ruptura de cápsides durante la extracción de ADN, que resultó negativa, determinando que el ADN bacteriano detectado debe estar localizado en el interior de las cápsides fágicas.

Entre los genes bacterianos presentes en los viromas, destaca la gran variedad de GRAs, entre ellos aquellos que proporcionan resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas (Tabla 3). Los GRAs son movilizados por bacteriófagos, que actúan como vehículos en su transmisión (Colomer-Lluch et al., 2011b; Fancello et al., 2011; Muniesa et al., 2004). Además, el análisis de las regiones flanqueantes de estos GRAs revelaron que la mayoría se localizaban en genomas bacterianos (plasmídico

o cromosómico), constatando que las partículas fágicas contienen en su mayoría ADN bacteriano, y en pocos casos se detectó ADN fágico (Brown-Jaque et al., 2018a; Enault et al., 2017; Fernández-Orth et al., 2019).

La presencia de fagos en muestras humanas puede tener graves implicaciones en la detección bacteriana, sobre todo si se basa en la detección de un gen específico, como el *16S ARNr*. Los fagos son capaces de adquirir genes bacterianos a través de la transducción lateral (Chen et al., 2018), generalizada (Thierauf et al., 2009) o especializada (Navarro & Muniesa, 2017). Independientemente del mecanismo de adquisición, el hecho de que los fagos empaqueten genes del *16S ARNr* (Fernández-Orth et al., 2019) dificulta la identificación de patógenos bacterianos, ya que se puede detectar *16S ARNr* originado en fagos y no en bacterias, ocasionando falsos positivos.

Para reducir o eliminar el número de bacteriófagos que pueden contaminar una muestra e interferir en los resultados, sin alterar la detección y recuento bacteriano, se puso a punto un método relativamente sencillo y económico. Las muestras se filtraron por membranas (DURAPORE) de tamaño de poro de 0,45 μm , que permiten el paso de bacteriófagos reteniendo las bacterias. Para verificar su eficacia, se inoculó una suspensión de concentración conocida de fagos *Stx* (10^5 UFP/ml) a muestras de orina, líquido ascítico y suero, y se realizó una amplificación por qPCR antes y después de la filtración por membranas. Asumiendo que cada fago lleva una copia del gen *stx*, y que el número de copias génicas detectadas es equivalente al número de fagos que presentan el gen *stx*, tras el paso de filtración se obtuvo una reducción de 2.17-3.22 unidades \log_{10} en las muestras analizadas (Fig. 3), confirmando la reducción del número de fagos *Stx* tras el paso de filtración.

Finalmente, para completar el estudio se inocularon concentraciones conocidas de bacteria (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y sus correspondientes bacteriófagos a muestras de orina, líquido ascítico y suero. Estas muestras se procesaron con y sin filtración por membranas, y se evaluó la eficacia comparando las muestras tras un paso de enriquecimiento, mediante su incubación antes y después del proceso de filtración (Tabla 4, Fig. 4). Con el método de filtración se obtuvo una reducción de 2-3 unidades \log_{10} de UFP/ml de fagos de *E. coli* y de *P. aeruginosa*, sin alterar al recuento bacteriano (Tabla 4, Fig. 4A), facilitando el aislamiento de la bacteria e impidiendo la propagación de los fagos y la lisis de la cepa huésped. Además, tras el paso de enriquecimiento, se observó que el recuento bacteriano en las muestras filtradas (F) era significativamente superior al de las muestras sin filtrar (NF) (Fig. 4B), con una mayor diferencia entre filtrado y sin filtrar en *E. coli* (Fig. 4B). Estos resultados confirman que la presencia de bacteriófagos en las muestras ejerce un efecto negativo en el crecimiento bacteriano y dificulta su detección.

Conclusiones

Los resultados de este estudio confirman la presencia de partículas fágicas infecciosas en diferentes fluidos humanos. Al analizar los viromas de estas muestras se detectó en la fracción fágica genes bacterianos, como el del *16S ARNr*, que coincidían con los posibles huéspedes de los fagos presentes en las muestras. Entre los genes bacterianos localizados en el interior de las cápsides fágicas destacaron, por su elevado número, genes de resistencia a diferentes antibióticos (GRAs), acentuando la importancia que pueden tener las partículas fágicas en la movilización de resistencias. La presencia de estos genes en la fracción fágica puede interferir en el diagnóstico molecular de patógenos bacterianos. Dicha interferencia es evitable mediante la aplicación de un método sencillo y poco costoso, basado en filtración por membranas, que permite eliminar fagos sin alterar el recuento bacteriano.



OPEN

Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples

Pedro Blanco-Picazo¹, Dietmar Fernández-Orth², Maryury Brown-Jaque¹, Elisenda Miró³, Paula Espinal³, Lorena Rodríguez-Rubio¹, Maite Muniesa¹✉ & Ferran Navarro^{3,4}

Bacteriophages are abundant in human biomes and therefore in human clinical samples. Although this is usually not considered, they might interfere with the recovery of bacterial pathogens at two levels: 1) by propagating in the enrichment cultures used to isolate the infectious agent, causing the lysis of the bacterial host and 2) by the detection of bacterial genes inside the phage capsids that mislead the presence of the bacterial pathogen. To unravel these interferences, human samples ($n = 271$) were analyzed and infectious phages were observed in 11% of blood culture, 28% of serum, 45% of ascitic fluid, 14% of cerebrospinal fluid and 23% of urine samples. The genetic content of phage particles from a pool of urine and ascitic fluid samples corresponded to bacteriophages infecting different bacterial genera. In addition, many bacterial genes packaged in the phage capsids, including antibiotic resistance genes and 16S rRNA genes, were detected in the viromes. Phage interference can be minimized applying a simple procedure that reduced the content of phages up to 3 logs while maintaining the bacterial load. This method reduced the detection of phage genes avoiding the interference with molecular detection of bacteria and reduced the phage propagation in the cultures, enhancing the recovery of bacteria up to 6 logs.

Bacteriophages (phages), viruses that infect bacteria¹, are probably the most abundant entities in the world². The abundance of phages in the human body is beginning to be envisaged as having a critical influence on human health. The ability of phage communities to modify and regulate bacterial communities^{3,4} suggests that phages are to some extent responsible for the homeostasis of the microbiota^{5,6}.

Phages can contribute to bacterial genomic plasticity by horizontal gene transfer (transduction)^{7,8}, which may benefit the metabolism⁹ or affect the virulence of the bacterial host^{10,11}. Some phages produce transducing particles consisting of phage capsids that carry only bacterial DNA^{12,13}, these transducing particles or elements similar to gene transfer agents (GTAs)¹⁴ are thought to be mechanisms used by bacterial cells to spread their own genomic content¹².

The existence of phages in human biomes presupposes their presence in human samples and their contamination of laboratory cultures initiated from these samples¹⁵. This interference can be envisaged at two levels: 1) phages may propagate in enriched liquid culture media (used to enhance analytical sensitivity and selectively propagate the pathogen) by infecting bacteria (the pathogen targeted for isolation) and causing their lysis during the process; and 2) phages can transport bacterial DNA, including virulence genes such as toxins¹⁶, antibiotic resistance genes (ARG)^{11,17,18} or bacterial 16S rRNA genes¹⁸. If any of these genes are targeted by molecular methods, positive results can be a confounding factor in the interpretation of results¹⁹.

The confirmation of phage interference in microbiological diagnosis, as envisaged in previous studies^{15,20}, would represent a serious impediment to the correct detection of bacterial pathogens. It may therefore be useful to evaluate strategies that allow the removal of phages from the human samples without interfering with bacterial recovery or entailing an unacceptable increase in time, efforts and costs. The aim of the present study was to address these issues.

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028, Barcelona, Spain. ²European Genome-phenome Archive, Centre for Genomic Regulation (CRG), Doctor Aiguader 88, 08003, Barcelona, Spain. ³Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Sant Quintí 89, 08041, Barcelona, Spain. ⁴Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ✉e-mail: mmuniesa@ub.edu

	Ascitic fluid	Blood	Serum	CSF	Urine	Total
N° of samples (individuals)	60	135 (52)	50	56	65 (53)	366 (271)
With phages showing infectivity on <i>E. coli</i> WG5 (%)*	34 (56.7)	7(13.5)	25 (50)	27(48.2)	21(39.6)	114 (42.1)
With phages showing infectivity and observed by TEM (%)	27 (45)	6 (11.5)	14 (28)	8 (14.3)	12 (22.6)	77 (28.4)
% <i>Myoviridae</i>	0	0	0	0	8.3	1.5
% <i>Siphoviridae</i>	51.9	50	51.9	12.5	16.7	41.8
% <i>Podoviridae</i>	18.5	16.7	18.5	37.5	8.3	20.9
% Capsid with no tail	29.6	33.3	29.6	25	66.7	32.8
% <i>Inoviridae</i>	0	0	0	25	0	3.0

Table 1. Human samples in which bacteriophages were detected. CSF: Cerebrospinal fluid. *Only detected with *E. coli* WG5, with *B. fragilis*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* were not observed.

Results

Detection of phages in human samples. Phages were detected in all sample types analyzed, first by infectivity assays (Table 1). Between 40–57% of all sample types contained phages able to infect *Escherichia coli* WG5, with the exception of blood (13.5%). Lysis plaques were not observed in any of the other bacterial species tested (*Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*).

Later, confirmation of the phage particles obtained from samples showing positive lysis on *E. coli* was conducted by Transmission Electron Microscopy (TEM). TEM observation of phages directly isolated from the samples was performed in those samples containing more than 10^7 – 10^8 phage particles/mL, the minimal required for TEM visualization¹³. Below this concentration no phage particles will be observed. When phages were not so abundant and therefore not observed by direct analysis, they were then recovered from the lysis plaques generated on *E. coli*. Nevertheless, despite our efforts to increase the amount of particles, some samples showing plaques of lysis on *E. coli* did not allow observation by TEM.

The lowest phage detection rate by TEM was in blood samples (11.5%), while serum, *a priori* a sample expected to produce similar results, showed higher percentages in both analyses (infectivity and TEM). On average, infectious phages were observed in 42.1% of the samples and in the 28.4% of them it was possible to visualize phage particles by TEM (Table 1).

Myoviridae, *Siphoviridae* (the most frequent), and *Podoviridae*²¹ phage morphological types were observed. Many samples showed icosahedral capsids of 40–60 nm of diameter compatible with these three groups but without a tail, which made them indistinguishable (Fig. 1). In two cerebrospinal fluid (CSF) samples (25%), filaments compatible with phages of the *Inoviridae* morphological type were observed (Table 1).

Virome analysis. Four pools of urine samples and one pool of ascitic fluid (AF) samples allowed the recovery of viral DNA in sufficient quantity and purity to generate the libraries. Before the capsids were broken, the samples were tested for 16S rRNA genes, and negative results confirmed the absence of non-packaged DNA and the effectiveness of the protocol¹⁸. Analysis of the virome showed a great number of unclassified sequences, that was greater in the AF and in two urine pool samples (Table 2), but the abundance of unclassified sequences did not correlate with the number of phages detected. The viromes confirmed the presence of bacteriophages in the samples and revealed coincidences with phages infecting different bacterial genera (Table 2; Fig. 2). Even if the identification of phage sequences by Kraken suggests a possible bacterial host, this cannot be confirmed only by sequence comparison with the databases. Nevertheless, all samples showed sequences of phages coincident with phages infecting *Propionibacterium* and *Staphylococcus*, and all samples showed the presence of CrAssphage, a human-specific phage first detected *in silico*²² that infects the genus *Bacteroides*. Viruses other than bacteriophages were detected in the viromes, being a poxvirus (BeAn 58058 virus)²³, human endogenous retrovirus and polyomaviruses the most frequently found in ascetic fluid. The latter ones, papillomaviruses and adenoviruses were the most frequently detected in the urine viromes.

Siphoviridae was the most abundant morphological type identified in phageomes, followed by *Myoviridae*. Virome 12 showed 89% of *Siphoviridae* and 9% of *Myoviridae*; virome 14 showed 87.5% *Siphoviridae* and 7.8% *Myoviridae*, virome 15 shows 85.1% *Siphoviridae* and 6.4% *Myoviridae*, virome 16 showed 88.6% *Siphoviridae* and 9.1% *Myoviridae* and virome 17 showed 75.9% of *Siphoviridae* and 13.8% *Myoviridae*. There was a lower presence of *Podoviridae* and unclassified morphology that corresponded mostly to CrAssphage viruses.

Bacterial genes in the virome. The five viromes analyzed (12, 14–17) showed bacterial DNA in the unassembled reads and in the contigs. While the bacterial DNA contamination during the viral DNA extraction was excluded by the controls used, the possibility of bacterial DNA contamination during the sequencing process was also excluded by the negative samples. Moreover, human sequences were not found in our viromes as should be expectable in case of contamination. Considering all this, we concluded that the bacterial DNA identified should be located within the phage capsids. We observed a great diversity of 16S rRNA gene sequences from different bacterial groups in contigs of different lengths (from 250 bp to various hundreds of bp) (Table 3; Fig. 2). Comparison of viromes of the four urine samples revealed that they shared some bacterial 16S rRNA gene sequences. Some bacterial genera to which this 16S rRNA gene belonged matched the hosts of the bacteriophages detected in the samples (Fig. 2, black bars). Other phages did not match the 16S rRNA gene sequences found in

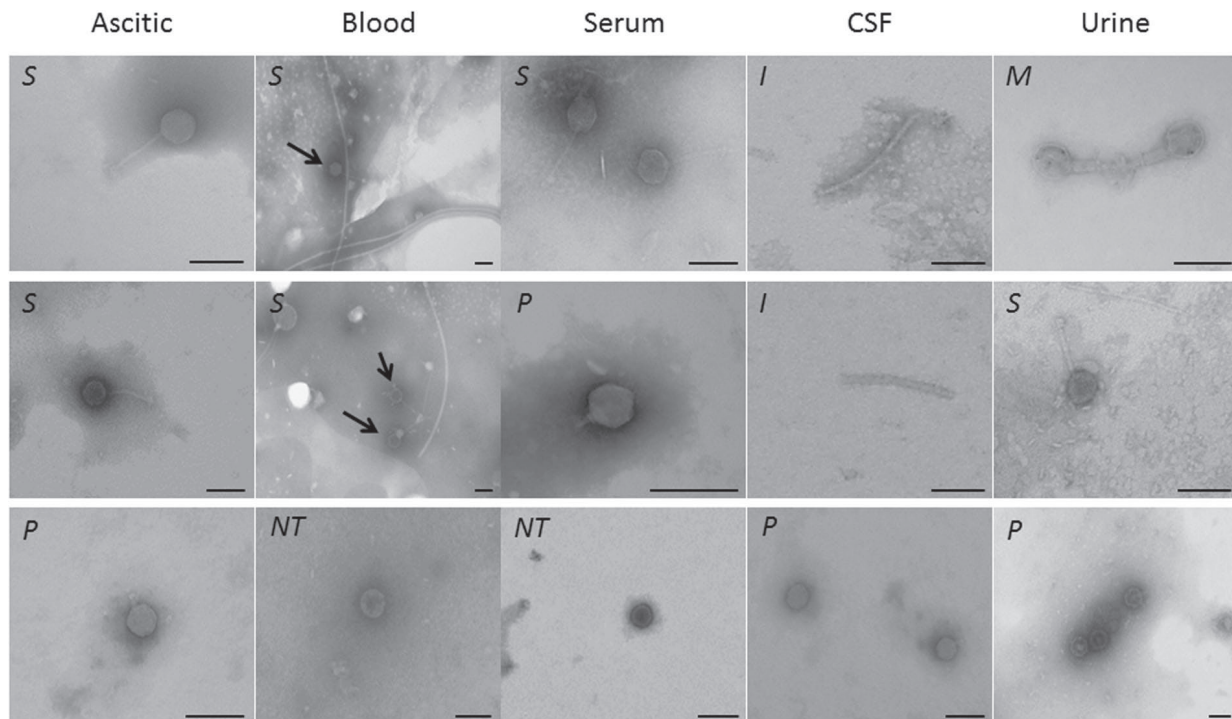


Figure 1. Electron micrographs of phages from ascitic fluid, blood, serum, cerebrospinal fluid (CSF) and urine. (M) *Myoviridae*, (S) *Siphoviridae*, (P) *Podoviridae*, (I) *Inoviridae* and (NT) structures compatible with phage capsids but not showing a tail. Bar 100 nm.

Name of Virome	N° of samples in the pool	Virome size: N° of reads (N° nucleotides)	N° of contigs (N° nucleotides)	N° of classified contigs (%)	N° of unclassified contigs (%)	N° of different phages	Possible phage host (number of phages)*
12	15 ascitic fluids	8456720 (2016.48 Mbp)	187729 (54.41 Mbp)	2774 (1.48%)	184955 (98.52%)	35	<i>Aeromonas</i> (1), <i>Bacillus</i> (2), <i>Caulobacter</i> (1), <i>Clostridium</i> (1), <i>Halocynthia</i> (1), <i>Propionibacterium</i> (22), <i>Salmonella</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> (1), <i>Vibrio</i> (2), <i>Yersinia</i> (1), crAssphage** (1)
14	17 urines	50078697 (13973.96 Mbp)	170329 (60.57 Mbp)	15491 (9.09%)	154838 (90.91%)	64	<i>Brochothrix</i> (1), <i>Enterobacteria</i> (1), <i>Erwinia</i> (3), <i>Escherichia</i> (7), <i>Pantoea</i> (1), <i>Salmonella</i> (5), <i>Enterococcus</i> (1), <i>Mycobacterium</i> (1), <i>Prochlorococcus</i> (1), <i>Propionibacterium</i> (36), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (4), <i>Streptococcus</i> (1), crAssphage (1)
15	21 urines	3516412 (999.81 Mbp)	35005 (14.99 Mbp)	17188 (49.10%)	17817 (50.90%)	47	<i>Aeromonas</i> (1), <i>Bacillus</i> (1), <i>Enterococcus</i> (2), <i>Lactobacillus</i> (4), <i>Lactococcus</i> (1), <i>Listeria</i> (1), <i>Mycobacterium</i> (1), <i>Propionibacterium</i> (29), <i>Rhizobium</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> (5), crAssphage (1)
16	15 urines	4867915 (1359.94 Mbp)	30101 (20.00 Mbp)	22117 (73.48%)	7984 (26.52%)	44	<i>Enterobacteria</i> (1), <i>Edwardsiella</i> (1), <i>Escherichia</i> (3), <i>Salmonella</i> (1), <i>Enterococcus</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (4), <i>Propionibacterium</i> (30), <i>Staphylococcus</i> (2), crAssphage (1)
17	6 urines	14093699 (3501.02 Mbp)	131414 (51.45 Mbp)	5362 (4.08%)	126052 (95.92%)	29	<i>Bacillus</i> (1), <i>Bacteroides</i> (1), <i>Enterococcus</i> (1), <i>Lactobacillus</i> (3), <i>Propionibacterium</i> (18), <i>Staphylococcus</i> (4), crAssphage (1)

Table 2. Viromes of the human samples and bacterial genes detected. *Number of different phages detected in each virome that show homology with sequences in the databases of phages infecting the bacterial host described. **crAssphage is a particular type of human-specific phage infecting *Bacteroides* genera.

the viromes, for example, *Aeromonas*, *Bacillus* or *Caulobacter* phages in the AF, and *Brochothrix*, *Prochlorococcus*, *Listeria*, *Mycobacterium* and *Enterococcus* phages in urines.

The viromes also contained a diverse range of ARGs, conferring resistance to aminoglycosides, β -lactams, fosfomicin, macrolides, phenicols, quinolones, sulfonamides, tetracyclines or trimethoprim (Table 3). Only those genes with a minimal identity of 97% in at least 60% of the sequence were defined as ARGs. The analysis of ARG flanking showed that most ARGs were located in bacterial genomes (plasmids or chromosome), and only one virome (#17) was found to contain genes conferring resistance to aminoglycosides (*aph(3')*-III and *ant(6)-Ia*) and to macrolides (*ermB*) located in a *Streptococcus* phage genome (GenBank: KT336321.1), although these genes also blasted against the *Enterococcus* chromosome.

Interference of phages with the molecular detection of bacteria. The elimination of phages from the samples was explored with the aim of finding a methodology that allows phage reduction without

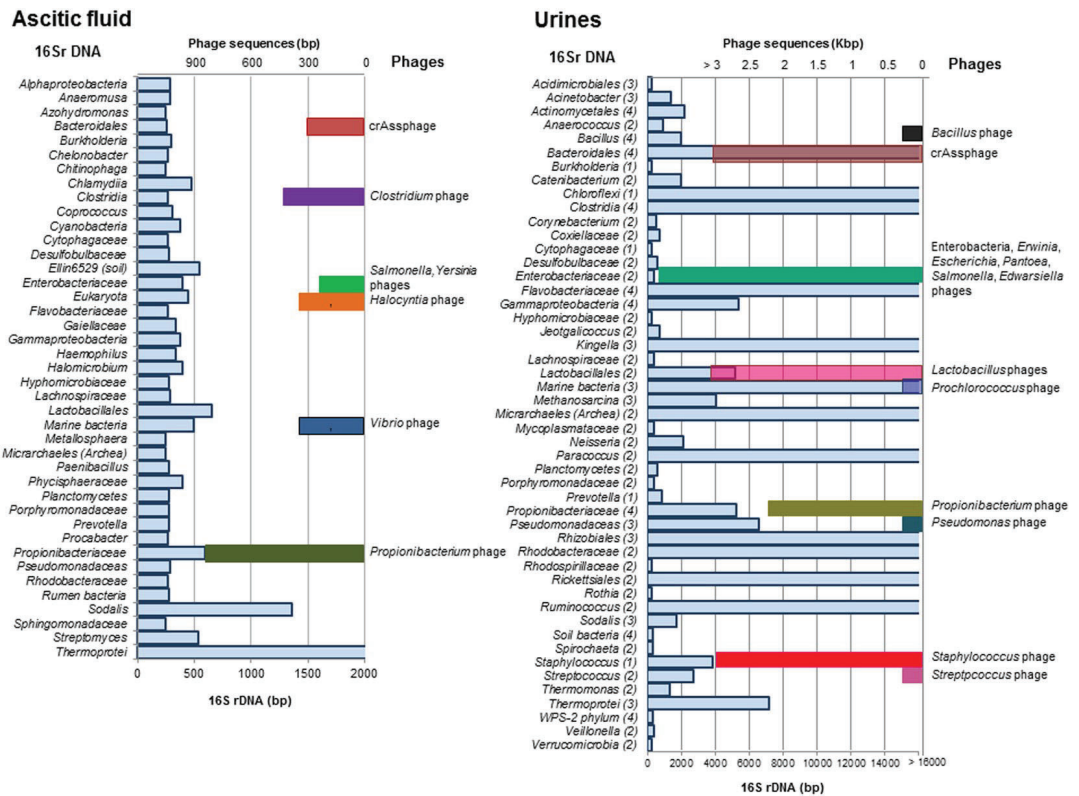


Figure 2. Identification of the 16S rRNA gene sequences found in the virome of a pool of ascitic fluids, and four pools of urine samples. On the left side of the chart: 16S rRNA gene sequences of diverse bacterial genera identified in the viromes. On the right side of the chart, bars indicate the coincidence with sequences of bacteriophages infecting particular bacterial groups. The length of the bars corresponds to the length of the contig in base pairs (bp). In the urine samples, next to each bacterial group and in brackets is shown the number of urine viromes in which the 16S rRNA gene sequence of each genus was detected.

disturbing bacterial recovery, a methodology that is suitable for routine use and has a minimal cost. Phages were removed physically by membrane filtration using DURAPORE membranes of 0.45 μm pore size. These low-protein-binding membranes allowed phage particles to pass through while retaining bacteria. To verify that phages had been physically removed from the samples, first a specific qPCR was performed targeting a *Stx* phage. Urine, AF and serum samples were spiked with 10^4 *Stx* phage particles (assuming that each phage carries one *stx* copy, the GC (gene copy) value is equivalent to the number of phages carrying *stx*) (Fig. 3). After filtration, a significant ($p < 0.05$) reduction from 2.17 to 3.22 \log_{10} units in the number of *Stx* phages was observed in all the samples analyzed and in all three independent replicates (Fig. 3).

Bacterial strain recovery. Urine, AF and serum samples containing *E. coli* or *P. aeruginosa* and their respective phages were processed with and without filtration. The influence of the filtration method on bacterial recovery was evaluated by comparing samples on an enrichment culture incubated for 18 h at 37 °C before and after processing (Table 4, Fig. 4).

A significant reduction of 2–3 \log_{10} PFU/mL was achieved for both *E. coli* and *P. aeruginosa* phages (Table 4, Fig. 4A) without affecting the bacterial recovery (Table 4). After incubation, the bacterial counts in filtered (F) samples were significantly ($p < 0.05$) higher than in the non-filtered (NF) samples (Fig. 4B). *E. coli* showed greater differences between F and NF samples than *P. aeruginosa*, suggesting higher rates of coliphage propagation in *E. coli* strain WG5. A difference in recovery was not attributable to the different matrices.

Discussion

In a previous study by our group, infectious bacteriophages were found in a limited set of urine and AF samples, resulting in phage interference with the isolation of the bacterial pathogen¹⁵. In the current study, a greater abundance of phages was detected in a wider range of human samples, indicating the presence of phages not only in urine and AF, but also in blood-sera and CSF with variable prevalence. While the detection of phages in animal serum samples was reported some time ago²⁴, and confirmed by metagenomics of blood²⁵, to our knowledge this is the first report of infectious phages in CSF of humans. A recent study of CSF in patients receiving hematopoietic stem cell transplantation showed contigs mapped to phages²⁶, although it is not clear whether the phages were already present in the patients, acquired after transplantation, or indeed if the CSF contained phages or remnant phage DNA.

Virome	N° of 16S rRNA gene*	N° ARG*	Antibiotic and resistance genes (bp)	ARG flanking region
12	78	1	Tetracyclines: <i>tetC</i> (1013)	P: <i>Salmonella</i>
14	96	15	Aminoglycosides: <i>aph(3'')-Ib</i> (804), <i>aadA5</i> (789), <i>aph(6)-Id</i> (831)	P: <i>E. coli</i> or <i>Klebsiella</i>
			β -lactams: <i>bla_{OXA-396}</i> (789), <i>bla_{TEM-1B}</i> (860), <i>bla_{PAD}</i> (1194)	C: <i>Pseudomonas</i>
			Fosfomycin: <i>fosa</i> (408)	C: <i>Pseudomonas</i>
			Macrolides: <i>mdfA</i> (1233), <i>mphA</i> (906)	P: <i>E. coli</i>
			Quinolones: <i>crpP</i> (198)	C: <i>Pseudomonas</i>
			Sulfonamides: <i>sul1</i> (840), <i>sul2</i> (816)	P: <i>E. coli</i>
			Tetracyclines: <i>tetC</i> (923), <i>tetA</i> (1200)	P: <i>Salmonella</i> or <i>Vibrio</i>
			Trimethoprim: <i>dfrA17</i> (474)	P: <i>E. coli</i>
15	45	6	Aminoglycosides: <i>aadA1</i> (758), <i>aadA2</i> (792)	P: <i>E. coli</i> or <i>Klebsiella</i>
			β -lactams: <i>bla_{TEM-116}</i> (861)	C: <i>Propionibacterium</i> or <i>Mycoplasma</i>
			Phenicols: <i>cmlA1</i> (1260)	P: <i>E. coli</i> or <i>Klebsiella</i>
			Sulfonamides: <i>sul3</i> (792)	P: <i>E. coli</i> , C: <i>Salmonella</i>
			Tetracyclines: <i>tetA</i> (1200)	P: <i>E. coli</i>
16	37	14	Aminoglycosides: <i>aac(3)-IIa</i> (861), <i>aph(6)-Id</i> (796), <i>aph(3'')-Ib</i> (521)	P: <i>E. coli</i> , C: <i>Klebsiella</i> or <i>Rheinheimera</i>
			β -lactams: <i>bla_{PAD}</i> (1182), <i>bla_{CTX-M-28}</i> (540), <i>bla_{TEM-1B}</i> (733)	C: <i>Pseudomonas</i> or <i>Klebsiella</i> . P: <i>E. coli</i>
			Fosfomycin: <i>catB7</i> (522), <i>catB3</i> (442)	C: <i>Pseudomonas</i>
			Quinolones: <i>oqxA</i> (1151), <i>qnrB1</i> (645), <i>fosA</i> (366)	C: <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> or <i>Salmonella</i>
			Tetracyclines: <i>tetA</i> (1015)	P: <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
			Trimethoprim: <i>dfrA14</i> (474)	P: <i>Klebsiella</i>
17	73	10	Aminoglycosides: <i>aph(3')-III</i> (795), <i>ant(6)-Ia</i> (909), <i>aac(6)-Ii</i> (549)	PH: <i>Streptococcus</i> phage C: <i>Enterococcus</i>
			Macrolides: <i>mdfA</i> (1233), <i>msrC</i> (1479), <i>ermB</i> (738), <i>ermT</i> (544)	PH: <i>Streptococcus</i> phage C: <i>Enterococcus</i>
			Tetracyclines: <i>tetM</i> (1225), <i>tetL</i> (1343)	C: <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
			Trimethoprim: <i>dfrG</i> (498)	C: <i>Enterococcus</i>

Table 3. Bacterial genes detected in the virome of the samples. P: Plasmid, C: Chromosome, PH: Phage genome *Number of different 16S rRNA genes or different ARGs that were detected in each virome as verified by Kraken.

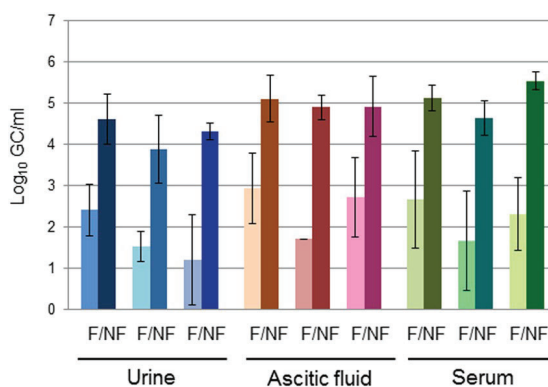


Figure 3. Phage reduction (log₁₀ gene copy [GC]) of the Stx phage after filtration through 0.45 μm low-protein-binding polyvinylidene fluoride membranes (F) versus non-filtered samples (NF). The results correspond to three independent experiments on each matrix.

The lowest percentage of phage detection was in blood samples, whereas nearly 50% of serum samples contained infectious phages. Although serum and blood samples are essentially the same, the blood samples were diluted in blood culture bottles prior to analysis, whereas sera were not. Moreover, blood is more difficult to handle, particularly for filtration through the membranes, which became clogged due to the high density of the

		<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
		Urine	Ascitic Fluid	Serum	Urine	Ascitic Fluid	Serum
Average phage counts	F	6.50×10^2 (1.58×10^2)	1.60×10^2 (1.89×10^2)	2.33×10^2 (1.44×10^2)	1.63×10^2 (7.77×10^1)	6.67×10^1 (2.89×10^1)	6.33×10^1 (1.58×10^1)
	NF	1.03×10^5 (1.00×10^4)	1.18×10^5 (6.66×10^3)	1.63×10^5 (8.96×10^3)	7.10×10^4 (1.95×10^4)	6.42×10^4 (1.74×10^4)	4.33×10^4 (7.57×10^3)
Average bacterial counts	F	7.67×10^1 (4.04×10^1)	4.63×10^2 (3.09×10^1)	1.75×10^2 (1.06×10^1)	8.00×10^1 (8.66×10^1)	1.57×10^2 (1.00×10^2)	1.07×10^2 (3.66×10^1)
	NF	9.50×10^1 (8.66×10^0)	2.25×10^2 (9.57×10^0)	1.83×10^2 (7.64×10^0)	1.17×10^2 (2.89×10^1)	3.37×10^2 (1.04×10^2)	1.13×10^2 (4.54×10^1)

Table 4. Values of phage (PFU/mL) and bacteria (CFU/mL) in the samples after the application of the filtration method (F) in comparison with the non-filtered controls (NF). In brackets, standard deviation.

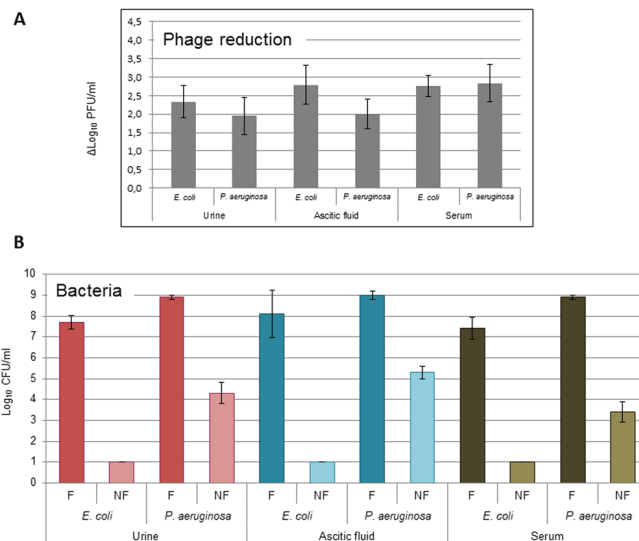


Figure 4. Phages can bias the outcome of enrichment cultures. **(A)** Reduction (\log_{10} PFU/mL) of phages infecting *E. coli* and *P. aeruginosa* in urine, AF and serum samples after the filtration procedure. **(B)** Recovery of culturable *E. coli* and *P. aeruginosa* (\log_{10} CFU/mL) in enrichment cultures of urine, AF and serum samples with (F) and without (NF) the filtration procedure. The results shown are the average of three independent experiments and error bars indicate the standard deviation.

samples. When blood was analyzed by TEM, a large number of particles of undefined nature were visible, which interfered with phage visualization and identification. As only clearly recognizable phage capsids were taken into account, a large number of phages in the blood probably remained undetected. In contrast, serum samples were more concentrated and easier to handle than blood, and phage prevalence detected in sera was markedly higher. The *Siphoviridae* morphological type was the most common group, as previously reported^{15,18,27}. *Siphoviridae* detection could have been underestimated in a percentage of samples showing icosahedral phage capsids compatible with *Siphoviridae* morphology but without a tail, which prevented their correct classification^{18,28–30}.

The wide range of phage hosts restricts their detection by culture. For example despite detecting phages of *Bacteroides*, *Enterococcus* or *Pseudomonas* in the viromes, phages infecting some strains of these bacterial genera have not been detected in this study. Moreover, phage detection by microscopy is limited by the density of phage particles (since TEM requires a minimum of 10^7 – 10^8 phage particles). In contrast, a more detailed picture of the diversity of phages in the samples was provided by the virome analysis. The multi-step phage DNA purification protocol was previously validated to guarantee that only DNA within viral capsids was evaluated¹⁸. This procedure, together with the limited number of phages in some of the samples, meant that sufficient DNA concentration and purity for the metagenomic analysis was only obtained in five pools of samples. Nevertheless, the viromes analyzed showed a far greater abundance of phages infecting a wider range of bacterial genera than in our previous study¹⁸. Phage identification was based on Kraken results, which in turn were based on database sequences. Therefore, the homology with an entry of a phage infecting a particular bacterial genus does not confirm that the bacterial host of this phage has been identified; it only indicates a potential host. Virus-host assignment is one of the most challenging issues when working with metaviromes and results obtained should be only considered as a match with the information in the databases. Genome similarity between different phages³¹ and the limited sequence data available for phages may have resulted in an underestimation or misidentification of phages, as a fraction of contigs were not classified. Surprisingly, some phage sequences in our viromes matched with phages infecting environmental bacteria. Moreover, the 16S rRNA genes of these bacterial groups

have also been detected. Although unexpected, marine bacteria, *Rizhobium* or plant pathogens have previously been reported in gut, urine or ascitic metagenomes^{32–36}. Accordingly, the detection of phage sequences matching with phages infecting these bacterial groups becomes more reasonable. These bacterial species and their phages could have been acquired through the diet or by cross-contamination between human biomes (e.g fecal-ascites, fecal-urine). It may also happen that there is an incorrect identification caused by similar viral sequences in the databases.

Viruses other than phages detected in the viromes were not as diverse or as abundant as phages, but this could be caused by the absence of infectious viruses in the samples if there was no viral infection and/or by the lower densities of animal viruses in comparison with the densities of bacteriophages, as previously reported^{30,37}.

As in the case of serum and blood, the inherently sterile CSF and AF could have been expected to give similar results. Yet considerable differences were observed, with AF giving the highest percentage of positive samples and CSF the lowest after blood. This indicates that translocation of bacteria and/or phages may occur between the digestive tract and peritoneal fluid, even spontaneously, and to a greater extent in patients with ascites. This translocation may be easier for virus particles than for bacteria^{15,37}. On the contrary, CSF is protected by the meninges and is located further away from highly contaminated regions such as the digestive tract.

In the case of urine, classically considered as sterile, it is exposed to contamination by the flora of the distal urethra, vagina and/or perineum during collection. Whether the phages in urine samples proceed from the urinary tract or the collection process, their presence can interfere with bacteriological analysis.

The presence of phages in a human sample has further implications when bacterial detection is based on targeting a specific gene, for instance, eubacterial 16S rRNA genes. Phages incorporate bacterial genes through lateral¹², generalized⁷ and specialized transduction^{7,37}. Regardless of the mechanism, phage particles packaging 16S rRNA genes have been reported in fecal phageomes¹⁸. Since DNA extraction methods do not distinguish between phage and bacterial DNA³⁸, the presence of phage DNA complicates pathogen identification or produces false positives. In this study, the diversity of 16S rRNA gene sequences in phage particles greatly exceeded the range of identified phages (Fig. 2), which may be explained by the higher number of bacterial 16S rRNA gene sequences in the genomic databases in comparison with the short repertoire of available phage genomes.

The bacterial genes identified in the viromes included ARGs, which are among the most relevant genes mobilized in phage capsids. The implications of this mobilization go beyond incorrect molecular detection, as it confirms that phage particles, by acting as vehicles for gene transfer and transduction, are a mechanism for the spread of ARGs^{39–41}. The ARG flanking regions corroborated that phage particles contained mostly bacterial and only in a few cases phage DNA^{13,18,42}.

The size of phages allows them to be removed easily by relatively cost-efficient protocols. In the present study, membrane filtration reduced phage particles without disturbing bacterial recovery and favored bacterial isolation by impeding phage propagation and bacterial lysis. These results confirm previous observations, in which *E. coli* was isolated from agar plates from AF samples containing phages, but not after enrichment in liquid cultures¹⁵.

Phage abundance in human samples is highly variable, so it is not always a key factor in bacterial recovery and/or identification. However, when abundant, phages can clearly interfere with diagnosis at different levels. The occurrence of phages in the human body was unsuspected until relatively recently. Now that their prevalence in human biomes has been demonstrated, this knowledge should be reflected in microbiological diagnosis by the incorporation of suitable protocols.

Methods

Samples. A total of 366 samples from 271 individuals were analyzed: 135 blood culture vials (referred to henceforth as blood) from 52 individuals, 65 urine samples from 53 individuals, 60 ascitic fluid (AF) samples from 60 individuals, 56 cerebrospinal fluid (CSF) samples from 56 individuals and 50 serums from 50 individuals. All samples were obtained from the Microbiology Laboratory of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) and were used after performing a conventional microbiological diagnosis.

All methods were carried out in accordance with official ethics regulations (Biomedical Research Law 14/2007, of July 3rd, and the provisions of Royal Decree 1716/2011, of 18th November) (<http://www.eurecnet.org/legislation/spain.html>), which establishes the treatment of biological samples of human origin for biomedical research purposes. The procedures were approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the Biomedical Research Institute of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain. Approval of the Ethics Committee included the exemption of obtaining the informed consent of the participants considering that samples were completely anonymized, that no data on the patients were collected and that samples were not stored but were destroyed immediately after the study.

Detection of phages in the samples. 5 mL of each sample was used for phage purification as previously described¹⁵. If the volume was insufficient (as in the case of CSF), it was raised to 2 mL with phosphate buffer saline (PBS). Samples were filtered through low protein-binding 0.22- μ m-pore-size membrane filters (Milllex-GP, Millipore, Bedford, MA), treated with chloroform (1:10), vortexed for 2 min and centrifuged at 16 000 \times g for 5 min, and then the supernatant was collected.

Phages were evaluated for infectivity using strains *Escherichia coli* WG5⁴³, *Bacteroides fragilis* RYC2056⁴⁴, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* 9108 as hosts by the double agar layer method¹.

Transmission electron microscopy (TEM) studies. 10 μ l of phage suspensions were dropped onto copper grids with carbon-coated Formvar films, negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) and examined under a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA) operating at 80 kV.

Virome analysis. Four pools of urine samples and one pool of AF samples (comprising between 6 and 21 samples) (Table 2) selected among those that showed presence of bacteriophages in the previous experiments were pooled to obtain viral DNA in sufficient quantity and purity to generate the libraries. Viral DNA was extracted as previously described¹⁸. Briefly, samples were filtered by 0.22- μm -pore-size membrane filters (Millex-GP, Millipore), 20-fold concentrated using protein concentrators, chloroform-treated to break possible vesicles and digested with DNase I (100 units/mL; Sigma-Aldrich, Spain) for 1 hour at 37 °C to eliminate non-packaged DNA. The DNase was inactivated by heating the suspension at 70 °C for 10 minutes. The absence of non-packaged bacterial DNA was verified by real time qPCR amplification of eubacterial 16S rRNA gene^{13,18}. These controls are expected to be negative if the protocol successfully eliminates most of the vesicles and DNA outside the viral capsids. Controls were applied to verify absence of inhibitors and correct DNase inactivation as in previous studies^{18,45}. Briefly, after DNase inactivation 10³ GC of *bla*_{TEM} gene were added to the controls and amplified by qPCR. An incomplete DNase inactivation, or the presence of inhibitors, would have resulted in a lower number of *bla*_{TEM} GC which was not observed.

Packaged DNA was extracted using a PowerSoil[®] DNA isolation kit (Qiagen Iberia, Barcelona, Spain).

Sequencing was performed as previously described using Illumina libraries generated following the Nextera XT (Illumina, Inc., San Diego, CA, US) manufacturer's protocol for paired-end libraries (2 × 150 bp)¹⁸. Bioinformatic analysis to identify phages in the virome and bacterial genes was performed as previously described¹⁸.

Sequence reads were quality checked with FASTQC v0.11.2 to detect any anomalies in the sequencing process. Raw data obtained from sequencing were processed with Trimmomatic (v0.36)⁴⁶. Clean reads were acquired by removing low-quality reads, sequences with N ratio >3%, and adapter sequences in reads. Reads were then *de novo* assembled with default parameters (k-mer sizes 21, 33, 55, 77 and 91) using SPAdes v3.13⁴⁷. Contigs were classified taxonomically with Kraken v0.10.5⁴⁸. ARGs were searched with ResFinder 3.2⁴⁹, with a 90% ID and 60% minimum length threshold. Sequences flanking the ARG genes detected by Resfinder were examined with BLAST⁵⁰ to ascertain whether the sequences were phage or bacterial. The search for 16S rDNA sequences was performed with Kraken2 with GreenGenes supported database (13_8) taking into account the contigs generated by Spades. To exclude contamination from the reagents used for metagenomic analysis⁵¹, negative controls were performed using negative samples that were processed in parallel and used the same DNA extraction protocol than the viromes presented in this study.

Removal of phages from the sample. To evaluate phage removal and bacterial recovery, urine, ascitic fluid and serum samples were spiked with 10² CFU/mL of *E. coli* strain WG5 or *P. aeruginosa* strain PA14 and with 10⁵ PFU/mL of phages that infect each strain (isolated from sewage). The spiked samples were divided in 2 aliquots of 10 mL, one remained untreated and the other was filtered through 0.45 μm low-protein-binding polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (DURAPORE membrane filter, Millipore) using a vacuum system that required from 1–5 minutes with the volumes of sample filtered in this study. Filtration step allowed bacteriophages to pass through the membrane while retaining bacteria. To remove more phages, the membranes were washed twice with 10 mL of PBS, gently agitated, and the filtration was repeated. The other 10 mL-aliquot was processed without filtration.

Bacteria retained in the filter after the filtration procedure were recovered by resuspending the membrane in 10 mL of PBS. The homogenate was added to 10 mL of Luria Broth (LB) 2-fold concentrated. In parallel, the non-filtered aliquot (10 mL) was also added to 10 mL of LB 2×. Bacteria and phages were enumerated in both aliquots by growth on LB agar plates (CFU/mL) and a double agar layer¹, respectively. Then, filtered (F) and non-filtered (NF) aliquots were incubated at 37 °C for 18 h and bacteria were enumerated on LB agar plates after incubation.

Molecular confirmation of phage reduction by filtration in urine, AF and serum samples was achieved by inoculating a suspension containing 10⁵ PFU/mL of Stx phage (containing the Shiga toxin (*stx*₂) gene), and the number of phages was evaluated by qPCR analysis of the *stx*₂ gene⁵².

qPCR procedures. qPCR assays for *stx* and 16S rRNA genes were performed as previously described^{18,52} under standard conditions in a Step One RT PCR System (Applied Biosystems). Genes were amplified in a 20 μl reaction mixture with the TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The reaction contained 1 μl of the DNA sample or quantified plasmid DNA^{18,52}. All samples were run in triplicate, as well as the standards and negative controls. Gene copy number (GC) was defined as the mean of the triplicate data obtained.

Statistical analysis. Statistical tests were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) in the Statistical Package for Social Science software (SPSS v19). A $p < 0.05$ was used to evaluate the differences between filtered versus non-filtered samples.

Data availability

The metagenomic data set generated was deposited to BioProject (PRJNA590575). Data can be checked under the following link: <https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA590575?reviewer=g6bbejub0bdr64b5ir5jkti3>. The URL will expire when this BioProject is publicly-released. All data generated are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 21 November 2019; Accepted: 31 March 2020;

Published online: 21 April 2020

References

- Adams, M. H. In *Bacteriophages* 592 (1959).
- Suttle, C. A. Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356–361 (2005).
- Letarov, A. & Kulikov, E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J. Appl. Microbiol* **107**, 1–13 (2009).
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G. J. & Weinbauer, M. G. Impact of viroplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 804–13 (2004).
- Manrique, P. *et al.* Healthy human gut phageome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 10400–10405 (2016).
- Abeles, S. R. & Pride, D. T. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *J. Mol. Biol.* **426**, 3892–906 (2014).
- Thierauf, A., Perez, G. & Maloy, A. S. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* **501**, 267–86 (2009).
- Darmon, E. & Leach, D. R. F. Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 1–39 (2014).
- Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M. & Chisholm, S. W. Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature* **438**, 86–9 (2005).
- Waldor, M. K. & Friedman, D. I. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 459–65 (2005).
- Muniesa, M. *et al.* Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1134–7 (2004).
- Chen, J. *et al.* Genome hypermobility by lateral transduction. *Science (80-)* **362**, 207–212 (2018).
- Brown-Jaque, M. *et al.* Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **51**, 434–442 (2018).
- Paul, J. H. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J.* **2**, 579–89 (2008).
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M. & Navarro, F. Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci. Rep* **6**, 33000 (2016).
- Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 560–602 (2004).
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**, e17549 (2011).
- Fernández-Orth, D. *et al.* Faecal phageome of healthy individuals: presence of antibiotic resistance genes and variations caused by ciprofloxacin treatment. *J. Antimicrob. Chemother* **74**, 854–864 (2019).
- Esparcia, O. *et al.* Diagnostic accuracy of a 16S ribosomal DNA gene-based molecular technique (RT-PCR, microarray, and sequencing) for bacterial meningitis, early-onset neonatal sepsis, and spontaneous bacterial peritonitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**, 153–60 (2011).
- Payan, A. *et al.* Method for isolation of Bacteroides bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, (2005).
- Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* at, http://books.google.es/books/about/Virus_Taxonomy.html?id=aFYaE9KXEXUC&pgis=1 (2011).
- Dutilh, B. E. *et al.* A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat. Commun.* **5**, 4498 (2014).
- Wanzeller, A. L. M. *et al.* Complete Genome Sequence of the BeAn 58058 Virus Isolated from Oryzomys sp. Rodents in the Amazon Region of Brazil. *Genome Announc.* **5**, (2017).
- Keller, R. & Traub, N. The characterization of Bacteroides fragilis bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteroides phage carrier cultures. *J. Gen. Virol.* **24**, 179–89 (1974).
- Moustafa, A. *et al.* The blood DNA virome in 8,000 humans. *PLoS Pathog.* **13**, e1006292 (2017).
- Pou, C. *et al.* Virome definition in cerebrospinal fluid of patients with neurological complications after hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Virol.* **108**, 112–120 (2018).
- Lusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R. & Górski, A. Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathog* **9**, 44 (2017).
- Pérez-Brocal, V. *et al.* Study of the Viral and Microbial Communities Associated With Crohn's Disease: A Metagenomic Approach. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **4**, e36 (2013).
- Stachler, E. & Bibby, K. Metagenomic Evaluation of the Highly Abundant Human Gut Bacteriophage CrAssphage for Source Tracking of Human Fecal Pollution. *Environ. Sci. Technol. Lett* **1**, 405–409 (2014).
- Ogilvie, L. A. & Jones, B. V. The human gut virome: a multifaceted majority. *Front. Microbiol* **6**, 918 (2015).
- Hatfull, G. F. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 447–53 (2008).
- Chen, Y. *et al.* Ascitic Bacterial Composition Is Associated With Clinical Outcomes in Cirrhotic Patients With Culture-Negative and Non-neutrocytic Ascites. *Front. Cell. Infect. Microbiol* **8**, 420 (2018).
- Noor Mat Isa, M. *et al.* Metagenomic Study of the Liver Microbiota in Liver Cancer-Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses of the Hepatocellular Carcinoma- Associated Microbial Communities and the Potential Role of Microbial Communities in Liver Cancer. *J. Gastrointest. Dig. Syst* **04**, 1–10 (2014).
- Morand, A. *et al.* Human Bacterial Repertoire of the Urinary Tract: a Potential Paradigm Shift. *J. Clin. Microbiol.* **57** (2019).
- Suzuki, T. A. & Worobey, M. Geographical variation of human gut microbial composition. *Biol. Lett* **10**, 20131037 (2014).
- Nam, Y.-D., Jung, M.-J., Roh, S. W., Kim, M.-S. & Bae, J.-W. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* **6**, e22109 (2011).
- Navarro, F. & Muniesa, M. Phages in the human body. *Front. Microbiol* **8**, 566 (2017).
- Quirós, P., Martínez-Castillo, A. & Muniesa, M. Improving detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli by molecular methods by reducing the interference of free Shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 415–421 (2015).
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J. & Muniesa, M. Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4908–4911 (2011).
- Muniesa, M. *et al.* Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1134–7 (2004).
- Fancelli, L., Desnues, C., Raoult, D. & Rolain, J. M. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2448–54 (2011).
- Enault, F. *et al.* Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J.* **11**, 237–247 (2017).
- Anonymous. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 2: Enumeration of somatic coliphages. (2000).
- Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. & Araujo, R. Diversity of Bacteroides fragilis strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Appl. Environ. Microbiol* **65**, 1772–6 (1999).
- Colomer-Lluch, M. *et al.* Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* **73**, 167–75 (2014).
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–20 (2014).
- Nurk, S. *et al.* In 158–170, https://doi.org/10.1007/978-3-642-37195-0_13 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013).
- Wood, D. E. & Salzberg, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* **15**, 46 (2014).

49. Zankari, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2640–4 (2012).
50. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410 (1990).
51. Salter, S. J. *et al.* Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* **12**, 87 (2014).
52. Imamovic, L., Serra-Moreno, R., Jofre, J. & Muniesa, M. Quantification of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages, by real-time PCR and correlation with phage infectivity. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1105–1114 (2010).

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III, cofinanced by the European Development Regional Fund, A Way To Achieve Europe, ERDF; the Fondo de Investigación Sanitaria (grant PI16/00158) and (AGL2016–75536-P), the Generalitat de Catalunya (2017SGR170). M. B-J has a grant from COLCIENCIAS (Republic of Colombia). P. B-P has a grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2017–081296). L. R.-R is supported by the Beatriu de Pinós postdoctoral programme of the Government of Catalonia’s Secretariat for Universities and Research of the Ministry of Economy and Knowledge. P.E. is supported by the Instituto de Salud Carlos III “Sara Borrell” contract number CD15/00017.

Author contributions

P.-B.P. performed the experiments of phage removal, M.B.-J. performed the microscopy studies, D.F.-O. performed the bioinformatic analysis, E.M., P.E. selected and analyzed the clinical samples and, L.R.-R. conducted genomic analysis and prepared the figures and the draft of the manuscript, M.M. and F.N. conceived and designed the study and prepared the final manuscript. All authors revised the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

4.2. Capítulo 2:

Empaquetamiento de genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas infecciosas aisladas de productos cárnicos y heces de pollo

Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces

Clara Gómez-Gómez, **Pedro Blanco-Picazo**, Maryury Brown-Jaque, Pablo Quirós, Lorena Rodríguez-Rubio, Marta Cerdà-Cuellar y Maite Muniesa

Scientific Reports (2019); 9(1), 1–11.

DOI: 10.1038/s41598-019-49898-0

Introducción

La resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas de salud pública en el siglo XXI.

El elevado uso de antibióticos en medicina humana y animal (Czekalski et al., 2015; Wu et al., 2016), siendo la mayoría excretados sin alterar al medio ambiente, genera una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas que favorece la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) y la aparición de bacterias resistentes (von Wintersdorff et al., 2016).

Los bacteriófagos son capaces de movilizar genes bacterianos, entre ellos GRAs, mediante mecanismos de transducción. En trabajos previos se ha confirmado la presencia de partículas fágicas con GRAs en ambientes con contaminación fecal, como lodos de depuradora y aguas residuales (Balcázar, 2014; Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2011a; Lekunberri et al., 2017b), así como en muestras de heces de animales y humanos (Brown-Jaque et al., 2018a; Colomer-Lluch et al., 2011b; Quirós et al., 2014).

Ahora se ha querido profundizar en la presencia de fagos con GRAs en matrices cárnicas. Además, sospechando que la microbiota intestinal puede ser el origen de las partículas fágicas con GRAs en muestras cárnicas, se ha evaluado su presencia en heces de pollo.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es confirmar la presencia de partículas fágicas infecciosas con GRAs en carnes de ternera, cerdo, pollo y embutidos (jamón y mortadela), evaluando su capacidad infectiva mediante un experimento de propagación sobre una cepa huésped (*E. coli* WG5). Finalmente, con el objetivo de verificar si la microbiota intestinal es un posible origen de partículas fágicas portadoras de GRAs, se evaluó la presencia de GRAS en fagos aislados de heces de pollo.

Resultados y discusión

En este estudio se analizaron muestras de carne picada de cerdo, ternera y pollo (10 muestras de cada matriz) y embutidos (5 muestras de jamón y 5 de mortadela) obtenidas de mercados y comercios locales del área de Barcelona.

Se analizó la presencia de bacterias aerobias totales con y sin resistencia a ampicilina para sopesar la carga bacteriana de las muestras e intentar determinar si presentaban algún tipo de resistencia a antibióticos, detectándose en todos los grupos de muestras bacterias resistentes a ampicilina (Tabla 1). Se detectó *E. coli*, utilizado como indicador de contaminación fecal, en muestras cárnicas de cerdo, pollo y ternera (Tabla 1), encontrándose también *E. coli* resistentes a ampicilina en las dos primeras (Tabla 1). Además, es destacable la detección en todas las matrices analizadas, excepto en mortadela, de colifagos somáticos (indicador de contaminación fecal vírico), con concentraciones correlativas al número de *E. coli* detectadas (Tabla 1).

En todos los parámetros analizados, la carne de pollo fue la que presentó el mayor porcentaje de positivos (Tabla 1), seguida de la carne de cerdo y vacuno. La detección de indicadores de contaminación fecal en carnes de pollo puede atribuirse a las condiciones de cría y almacenamiento de la carne previa a su venta, incrementándose el riesgo de contaminación en las carnes picadas, donde los microorganismos presentes en superficie pueden llegar a penetrar en el producto tras su manipulación, siendo esencial en estos casos un buen cocinado de este tipo de carnes (Luber, 2009). No obstante, todas las muestras analizadas fueron consideradas aptas para su consumo según la normativa para carnes picadas (The Commission of the European Communities, 2005) (Tabla 1). A pesar de que se detectó un elevado número de bacterias resistentes a β -lactámicos, actualmente no existe ninguna legislación que regule o monitorice las bacterias resistentes a antibióticos, los GRAs, o los agentes implicados en su movilización, y la detección de bacteriófagos como indicadores sólo se contempla en aguas (US.EPA, 2016).

Se ha demostrado que los fagos persisten mejor que las bacterias ante ciertos tratamientos antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria (Calero-Cáceres & Muniesa, 2016), y el uso de ciertos aditivos alimentarios (Colomer-Lluch et al., 2014a), puede inducir el ciclo lítico de algunos profagos. Los fagos pueden dispersarse al ambiente o a los propios alimentos, y al ser ingeridos llegar a la microbiota intestinal siendo capaces de transducir su material genético (Tóth et al., 2003).

La amplificación de GRAs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *armA*, *mecA*, *qnrA*, *qnrS* y *sul1*) en la fracción de ADN fágico mediante qPCR, se llevó a cabo tanto en las muestras directas (antes de propagar) como tras el paso de propagación. En el análisis de las muestras directas sólo se detectó el gen *bla*_{VIM} en una muestra de carne de ternera (Fig. 1), siendo indetectable después de propagar. En cambio, tras el experimento de propagación, se detectaron GRAs en todos los grupos de muestras analizadas, entre un 10-80% de muestras positivas (Fig. 1), indicando la presencia de partículas fágicas infecciosas para *E. coli* WG5.

A pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos, en las muestras de jamón, con sólo 5 muestras analizadas, se detectaron hasta 6 GRAs, con un 80% de las muestras positivas para el gen *bla*_{CTX-M-1}. Por el contrario, en la mortadela sólo se detectó el gen *sul1* en una de las muestras. El proceso de elaboración de embutidos suele incluir tratamientos y conservantes capaces de eliminar microorganismos. Sin embargo, el elevado porcentaje de GRAs detectados en jamón podría deberse a una contaminación por manipulación o a una contaminación cruzada con otros productos.

En las carnes picadas también se detectaron 6 GRAs en carnes de cerdo y pollo y 5 en ternera, siendo *sul1* el gen más prevalente en todas las matrices (Fig. 1), seguido por *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{TEM}. *armA*, un GRA muy prevalente en crías de pollo (García-Galán et al., 2009), sólo se detectó en una muestra de carne de pollo. El único GRA que no se detectó fue *mecA*, pudiendo estar simplemente ausente en estas muestras, aunque ya que *mecA* se ha relacionado con *Staphylococcus spp.*, probablemente las partículas fágicas que contienen *mecA* pueden ser incapaces de propagar en *E. coli*, lo que podría explicar su ausencia.

En el análisis de los datos de abundancia de los GRAs detectados sólo se consideraron aquellas muestras positivas con valores dentro de los límites de cuantificación establecidos por nuestra curva estándar (Fig. 2). Al tratarse de valores obtenidos tras un paso de enriquecimiento, los datos de abundancia de GRAs no pueden considerarse como un valor absoluto, aunque la detección de un elevado número de copias permite asumir que éstos estaban presentes en las muestras analizadas directamente, aunque a niveles por debajo del límite de detección de la técnica. Los valores obtenidos se correlacionan con los datos de prevalencia, donde el gen *sul1* (más prevalente) (Fig. 1), presentó los valores más altos de

abundancia (Fig. 2), hecho atribuible al amplio uso de sulfonamidas en medicina veterinaria en la Unión Europea (García-Galán et al., 2009; Kemper, 2008). Además, en carne de cerdo y jamón, los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{TEM} también presentaron valores superiores a 10⁹ CG/25g en algunas muestras (Fig. 2). La elevada concentración de genes que proporcionan resistencia a antibióticos β -lactámicos está estrechamente relacionada con su uso en veterinaria y a la elevada presencia de bacterias productoras de BLEA en heces animales (Coque et al., 2008; Mesa et al., 2006), y concuerda con la presencia de GRAs en la fracción de ADN fágico en aguas residuales animales.

Los experimentos de propagación confirman que una parte de las partículas con GRAs detectadas son infecciosas, y que los fagos pueden jugar un papel importante en la transferencia horizontal de genes de resistencia ya que no requieren contacto directo entre la célula donadora y la receptora. La transferencia de GRAs puede deberse a mecanismos de transducción generalizada, generando partículas transductantes, como previamente se ha reportado en fagos de *Salmonella* en muestras cárnicas de pollo (Shousha et al., 2015), aunque también pueden tener su origen en fagos atemperados inducidos de cepas bacterianas (Brown-Jaque et al., 2018a; Lee & Park, 2016). Recientemente se ha descrito un nuevo modelo de transducción, denominada lateral (Chen et al., 2018), donde fagos atemperados empaquetan ADN bacteriano localizado aguas abajo de su punto de inserción. Las partículas generadas mediante la transducción generalizada o lateral sólo contienen ADN bacteriano, carecen de genes fágicos, y por tanto no tienen la capacidad de propagar. En este estudio, una fracción de fagos (aunque no todos) han sido capaces de propagar, lo cual es indicativo de que esos fagos son infecciosos. No obstante, no se consiguió transducir los GRAs analizados. Esto podría explicarse por diversas razones: las partículas fágicas de las muestras son capaces de propagar, pero no de transducir el GRA; la bacteria huésped no posee las regiones que permitan la recombinación del GRA; o hay otros fagos virulentos en las muestras que propagan y lisan a las bacterias transductantes antes de ser aisladas.

Con el objetivo de explorar el posible origen fecal de los GRAs detectados en fagos de la carne de pollo, este estudio se completó con el análisis de 37 muestras de heces obtenidas del ciego de crías de pollos durante el año 2015. Al tratarse de muestras de archivo congeladas, sólo se analizaron GRAs en la fracción de ADN fágico y no se realizó propagación, ya que los microorganismos viables y los virus infecciosos podrían estar parcial o totalmente inactivados. El gen que apareció en un mayor porcentaje de muestras fue *qnrA*, seguido de *sul1* (Fig. 3A). El GRA más abundante (con mayor CG/25g) fue *sul1* (Fig. 3B). A pesar de la alta prevalencia de resistencia a quinolonas, con un 43% de positivos para el gen *qnrA*, fueron de las menos abundantes (Fig. 3B), lo cual está acorde con lo que previamente se había detectado en aguas fecales de animales (Colomer-Lluch et al., 2014a). Antibióticos

como las sulfonamidas y las quinolonas presentan una fuerte adsorción en las heces (Kemper, 2008), y su presencia podría ejercer una presión selectiva que mantuviera sus correspondientes resistencias en los microorganismos. Las β -lactamasas, en cambio, se encontraron en un menor número de muestras, pero en altas concentraciones (Fig. 3B). Al igual que en carne de pollo, también se detectó el gen *armA* en heces de pollo (Fig. 3B).


Conclusiones

El uso intensivo de antibióticos en la producción avícola conlleva una elevada presión selectiva en la microbiota de los pollos (Xiong et al., 2018), incrementando el riesgo de transmisión y dispersión de resistencias mediada por partículas fágicas. La presencia de partículas fágicas con GRAs en heces de pollos sugiere que la microbiota intestinal es un reservorio de GRAs, y el origen más probable de las partículas fágicas con GRAs detectadas en carnes.

Los experimentos de propagación evidencian que parte de las partículas fágicas con GRAs son infecciosas. Dado que la infección es el primer paso en la transducción de GRAs, este trabajo aporta evidencias del papel de los fagos en la movilidad de GRAs en animales por una contaminación cruzada o de humanos a través de la cadena alimentaria. En ausencia de una normativa en materia de seguridad alimentaria que monitorice los bacteriófagos, su consumo puede constituir un riesgo para la salud pública, siendo necesario un mayor estudio de la transmisión de GRAs mediada por bacteriófagos a través de la cadena alimentaria.

OPEN

Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces

Clara Gómez-Gómez¹, Pedro Blanco-Picazo¹, Maryury Brown-Jaque¹, Pablo Quirós¹, Lorena Rodríguez-Rubio¹, Marta Cerdà-Cuellar² & Maite Muniesa¹ 

Bacteriophages can package part of their host's genetic material, including antibiotic resistance genes (ARGs), contributing to a rapid dissemination of resistances among bacteria. Phage particles containing ARGs were evaluated in meat, pork, beef and chicken minced meat, and ham and mortadella, purchased in local retailer. Ten ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *qnrA*, *qnrS*, *mecA*, *armA* and *sul1*) were analyzed by qPCR in the phage DNA fraction. The genes were quantified, before and after propagation experiments in *Escherichia coli*, to evaluate the ability of ARG-carrying phage particles to infect and propagate in a bacterial host. According to microbiological parameters, all samples were acceptable for consumption. ARGs were detected in most of the samples after particle propagation indicating that at least part of the isolated phage particles were infectious, being *sul1* the most abundant ARG in all the matrices followed by β -lactamase genes. ARGs were also found in the phage DNA fraction of thirty-seven archive chicken cecal samples, confirming chicken fecal microbiota as an important ARG reservoir and the plausible origin of the particles found in meat. Phages are vehicles for gene transmission in meat that should not be underestimated as a risk factor in the global crisis of antibiotic resistance.

Antibiotic resistance is a major threat to public health and food security. A decreasing production of new antimicrobial compounds and a reduced effectiveness of the existing ones caused by the emergence of resistant bacteria is resulting in higher mortality rates¹. The uncontrolled use of antibiotics and the ability of bacteria to mutate or acquire external genes is leading to the emergence of resistant strains. Epidemiological studies confirm that antibiotic consumption is directly correlated with the emergence and dissemination of resistance².

Natural antibiotics have existed for billions of years in bacterial ecosystems as a strategy for adaptation and defense against other bacteria³, resulting in a simultaneous evolution of antibiotic resistance genes (ARGs)⁴. The resistance originated in environmental reservoirs and transmitted to human pathogens⁵ has been exacerbated by exposure to antibiotics present in clinical and agricultural settings^{6,7}. Indeed, most of the antibiotics used in medicine, livestock and aquaculture are excreted practically unaltered to the environment, generating a pressure that selects for naturally occurring resistant strains and their accompanying ARG⁸. Bacteria can be intrinsically resistant to antibiotics or can become resistant by mutation or by acquisition of ARGs by horizontal gene transfer^{9,10}. While conjugation and transformation are well-studied mechanisms, transduction, which is understood as gene transfer mediated by a bacterial virus or bacteriophage/phage, is attracting increasing attention and has perhaps been underestimated^{11,12}.

Three mechanisms of transduction have been described so far; specialized transduction¹³, mediated by temperate phages that lysogenize the bacterial cell and mobilize the genes adjacent to their insertion site. Generalized transduction¹⁴ mediated by virulent phages that package bacterial DNA instead of phage DNA. And the most recent mechanism described, lateral transduction mediated by temperate phages that do not excise from the bacterial chromosome after induction and generate capsids able to package only bacterial DNA located downstream

¹Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028, Barcelona, Spain. ²IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.M. (email: mmuniesa@ub.edu)

Received: 13 May 2019

Accepted: 29 August 2019

Published online: 16 September 2019

Microorganism		Pork	Beef	Chicken	Ham	Mortadella
n		10	10	10	5	5
Total aerobic bacteria	%	80	100	100	100	100
	Media	$6.2 \cdot 10^5$	$4.5 \cdot 10^5$	$2.1 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^5$	$2.1 \cdot 10^5$
	SD	$3.3 \cdot 10^2$	$4.3 \cdot 10^1$	$6.7 \cdot 10^3$	$1.0 \cdot 10^3$	$4.2 \cdot 10^2$
Total aerobic bacteria amp ^R	%	40	100	100	100	100
	Media	$2.4 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^5$	$6.3 \cdot 10^5$	$6.7 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^4$
	SD	$1.2 \cdot 10^1$	$2.0 \cdot 10^1$	$7.1 \cdot 10^4$	$8.0 \cdot 10^4$	$6.6 \cdot 10^4$
<i>E. coli</i>	%	30	30	90	0	0
	Media	$2.3 \cdot 10^3$	$3.7 \cdot 10^1$	$3.3 \cdot 10^3$	<41.6	<41.6
	SD	$2.7 \cdot 10^3$	—	$7.3 \cdot 10^3$	—	—
<i>E. coli</i> amp ^R	%	30	0	90	0	0
	Media	$6.6 \cdot 10^2$	<41.6	$2.8 \cdot 10^3$	<41.6	<41.6
	SD	$4.7 \cdot 10^2$	—	$6.7 \cdot 10^2$	—	—
Somatic coliphages	%	60	50	100	40	0
	Media	$3.2 \cdot 10^2$	$6.7 \cdot 10^1$	$2.3 \cdot 10^3$	$1.9 \cdot 10^1$	<12.5
	SD	$2.5 \cdot 10^2$	$5.0 \cdot 10^1$	$2.1 \cdot 10^3$	$8.8 \cdot 10^0$	—

Table 1. Bacterial and viral indicators. Total aerobic bacteria and *E. coli* grown in the absence or presence of ampicillin were enumerated as bacterial indicators (CFU/25 g) while somatic coliphages were enumerated as viral indicators (PFU/25 g) in the food samples. SD Standard deviation.

the phage insertion site with great efficiency¹⁵. While temperate phages can propagate in a suitable host strain generating phage progeny, transducing particles (containing only bacterial DNA) generated by generalized or lateral transduction, can infect a new host cell but do not possess phage genes and therefore are unable to propagate.

Bacteriophages are globally ubiquitous and extremely abundant, with an estimated 10^{31} bacteriophages in the biosphere¹⁶. There is also a high percentage (from 4 to 68%) of lysogenic bacteria containing inducible prophages in different ecosystems¹⁷. Thanks to their structural characteristics, bacteriophages are highly persistent in the environment, the capsid acting as a shield that protects the packaged DNA^{18,19}. Phage particles carrying ARGs have been described in a range of environments, including sludge, soil and sewage^{20–23}. Their origin in sewage is probably human fecal pollution, including healthy humans and hospital wastes, and animal fecal pollution from farms, which is supported by the detection of ARG-containing phage particles in human and animal feces^{24–26}. ARG-containing phage particles have also been found in the human respiratory tract²⁷. Thus, the most plausible origin of these particles, whether in the intestines or respiratory tract, is the microbiota²⁵. Once free ARG-containing phage particles enter the environment, they can end up in food, as shown in a recent study of vegetables classed suitable for human consumption²⁸, and therefore be ingested.

This study focus on the occurrence of ARG-containing phage particles in meat products and, considering that the origin of the particles might be the intestinal microbiota of antibiotic-treated animals, they were also evaluated in chicken cecal samples.

Results

Microbiological parameters of the samples. The morphological types of the colonies grown in TSA were quite homogeneous with few differences. Even if we did not identified the different populations of total aerobic bacteria, we assessed that the majority of the aerobic bacteria were resistant to ampicillin (Table 1) with differences close to $0.5 \log_{10}$ units between the number of colonies grown in the absence or presence of ampicillin. Dark blue colonies on Chromocult agar were identified as *E. coli*. These were detected in pork, beef and chicken samples, whereas amp-resistant *E. coli* (dark blue colonies grown on Chromocult agar containing ampicillin) was detected only in pork and chicken (Table 1). In pork and chicken, the differences were of 0.5 and $0.07 \log_{10}$ units, respectively between the number of colonies grown with or without ampicillin, showing also that the largest fraction of the *E. coli* detected was amp-resistant. Somatic coliphages were detected in all samples except mortadella, with an abundance correlating with that of *E. coli*.

Minced chicken gave the highest percentage of positive samples for all the indicators and the highest average values of all microorganisms (Table 1), followed by minced pork (not all samples were positive for total aerobic bacteria) and minced beef. *E. coli* was not detected in ham and mortadella, whereas somatic coliphages were undetectable in mortadella but present in ham, albeit at very low densities.

Detection of ARGs in the DNA from phage particles in meat matrices. The ARGs from the DNA extracted from phage particles in each meat matrix were quantified by qPCR. The samples were considered positive when giving amplification values of the target gene within the limit of quantification (LOQ), which was previously defined with standard curves. Those samples outside the LOQ but within the limit of detection and those that did not show any increase in fluorescence in the qPCR cycles (indeterminate samples) were discounted for the study of gene prevalence.

When ARGs were analyzed in the DNA of phage particles extracted directly from each sample, only *bla*_{VIM} was detected in one beef sample. After propagation, ARGs were identified in DNA from the phage particles in

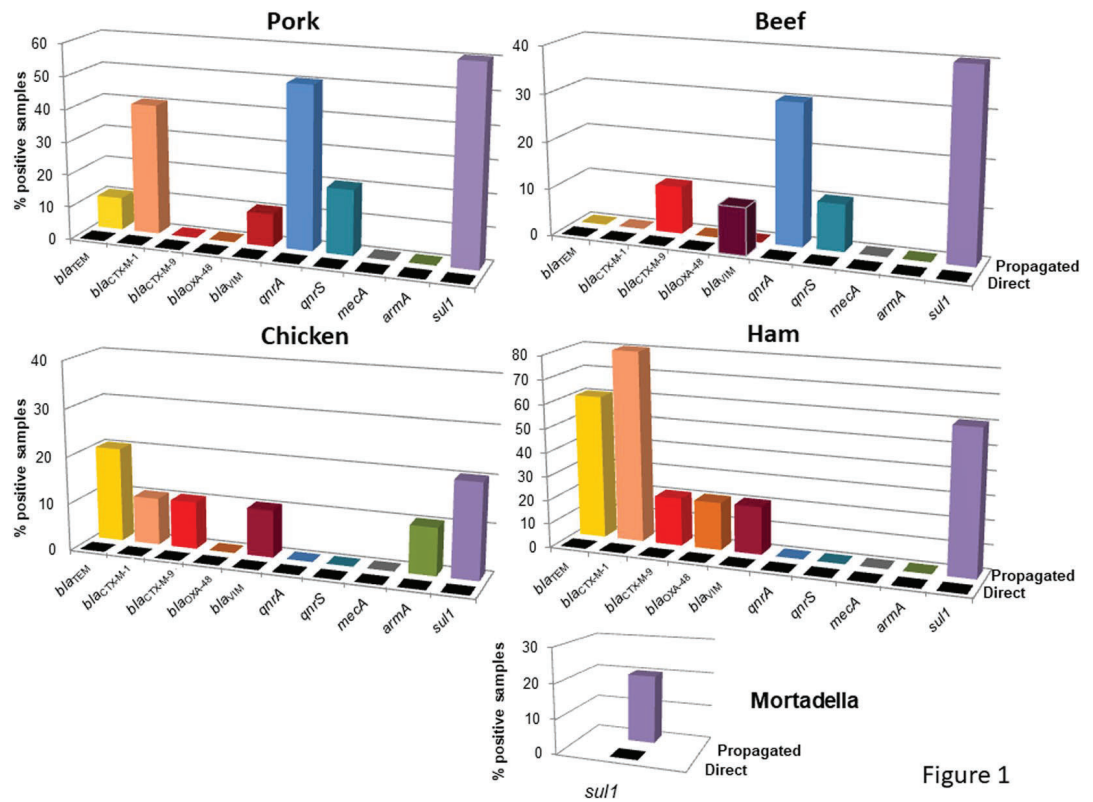


Figure 1

Figure 1. Percentage of positive samples for each ARG in each meat matrix before (direct) and after propagation in the *E. coli* WG5 enrichment culture (propagated). All the values represented are within the limit of quantification.

all the matrices, with 10–80% of samples testing positive, depending on the matrix (Fig. 1). The heterogeneous results initially made it difficult to assess which matrix had a higher percentage of positive samples for the different ARGs. In ham, despite only 5 samples being analyzed, 6 ARGs were detected and 4 out of the 5 samples (80%) were positive for *bla*_{CTX-M-1}. In contrast, in mortadella only *sul1* was detected, in only one sample (Fig. 1). Among the minced meats, the highest percentages of samples positive for ARGs were in pork (6 ARGs in up to 60% of samples), followed by chicken and beef (6 ARGs in up to 20% and 5 ARGs in up to 40% of samples, respectively). The most prevalent gene was *sul1*, followed by *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{TEM}. *bla*_{OXA-48} was only detected in one sample of ham, which was the most polluted meat according to the fecal indicators (presence of total aerobic bacteria: 2.24×10^4 CFU/25 g; absence of *E. coli* but presence of somatic coliphages: 1.25×10^1 PFU/25 g). Accordingly, the same sample of ham also showed the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{VIM} and *sul1*.

One chicken sample was positive for *arma*, a prevalent ARG in poultry. This sample also contained fecal pollution indicators (*E. coli* and somatic coliphages), although at below average values (Table 1), as well as *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-1}. The only tested gene undetected in all the samples of this study was *mecA*.

Abundance of ARGs in the DNA from phage particles. ARG abundance was evaluated in the samples with levels within the LOQ (Fig. 2). This was determined by the last valid Ct for each ARG assay (Table 2) in the standard curve that is consistent in the diverse replicates.

The abundance of ARGs cannot be considered as an absolute value, because it was ascertained after an enrichment step. Nevertheless, it can be assumed that ARGs with a higher copy number may also have been more abundant in the directly analyzed samples, but at levels below the limit of detection. Also, the detection of ARGs in DNA from phage particles after the enrichment cultures indicates that the phage particles were able to infect and propagate on the host strain and were therefore infectious.

As indicated in the previous section, the only ARG detected in DNA from the phage particles isolated directly from minced beef was *bla*_{VIM}, at an abundance of 6.2 log₁₀ GC in 25 g of a single sample. This sample showed values of amp-resistant total aerobic bacteria of 2.63×10^4 CFU/25 g, below the average for beef, and an absence of *E. coli* or amp-resistant *E. coli*. The inability of the particles harboring *bla*_{VIM} in this sample to infect *E. coli* WG5 was demonstrated by the absence of the gene after propagation, suggesting that the particles ceased to be infectious or that the strain was an unsuitable host.

As well as being the most prevalent, *sul1* was the most abundant gene on average, reaching densities close to or higher than 10^8 GC/25 g in all the samples (Fig. 2). In minced pork and ham, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{TEM} levels were also quite high, reaching 10^9 GC/25 g (Fig. 2). The genes with the lowest densities were *qnrA* and *qnrS*. The other genes gave very heterogeneous signals. In mortadella, only *sul1* was detected in a single sample, with values of $10^{7.7}$ GC/25 g after propagation.

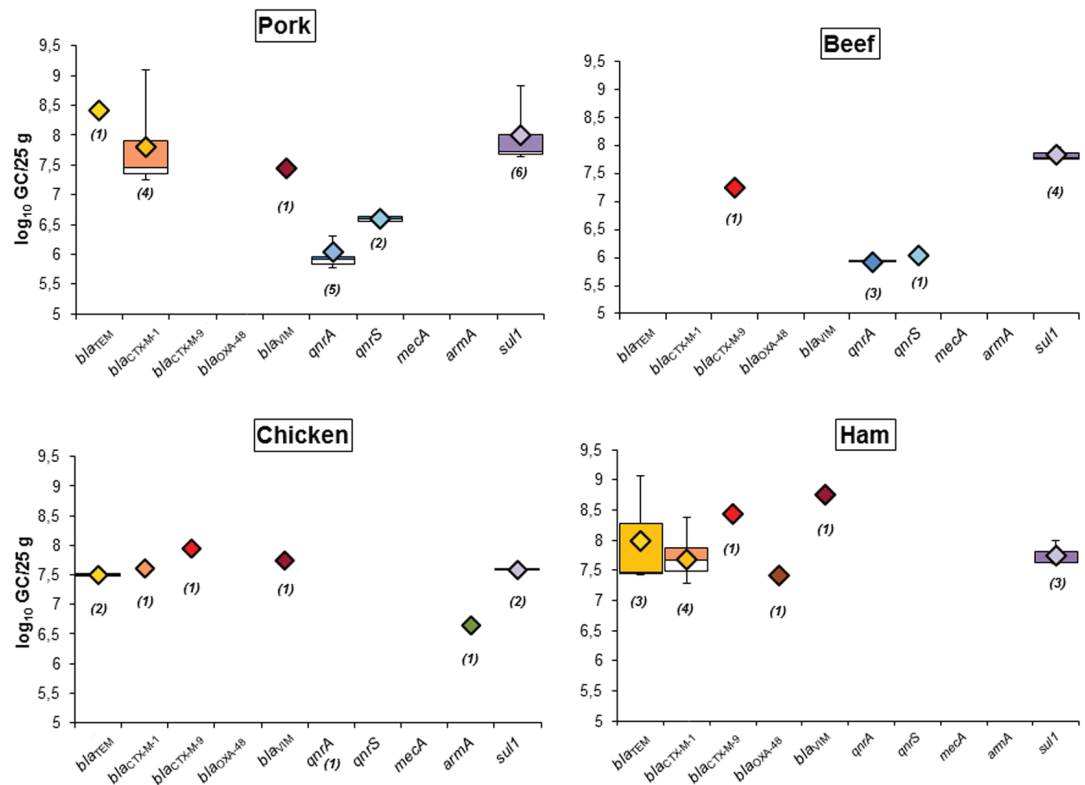


Figure 2

Figure 2. Abundance of ARGs in the DNA isolated from the phage particles of each meat matrix and ham after propagation in the *E. coli* WG5 enrichment cultures. Data is represented in boxplots (\log_{10} GC/25 g). The diamond represents the average value of the positive samples, the upper squares include samples that present values within the 75th percentile, and in the lower white boxes the values are shown within the 25th percentile. The number of samples appears in brackets.

ARGs in DNA in phage particles isolated from chicken feces. We tested 37 archived samples of chicken feces obtained in 2015 from the cecum of broiler chickens at a slaughterhouse covering the area of north-eastern Spain. As the chicken meat samples gave the highest values of fecal indicators (Table 1), the ARGs in the phage DNA fraction of chicken fecal samples were evaluated for any correlation with the high levels of ARGs detected in chicken meat.

In this set of samples, microbiological parameters were not analyzed and ARGs were only screened in the DNA of phages directly isolated from the feces without any propagation step. As these archive samples had been frozen for three years, it was considered that viable microorganisms and infectious viruses would have been partially or totally inactivated during storage. In addition, the results (Fig. 3) showed that the concentrations of ARGs in the feces were sufficiently high to be detected without further propagation. The most prevalent genes were *qnrA* and *sul1*, (Fig. 3a), a pattern more similar to the beef and pork samples than to the chicken meat.

The most abundant ARG (Fig. 3b) in chicken feces was again *sul1*. The abundance of quinolone resistance genes was lower, although *qnrA* was present in 43% of the samples. Compared to *sul1* or *qnrA*, the β -lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9} were found in a smaller number of samples, but at high densities of 10^6 – 10^7 GC/25 g. The level of *bla*_{OXA-48} was similar to that of the other β -lactamases in only one sample, and *bla*_{VIM} was not detected at all. As in all the other analyses, *mecA* was not found. Finally, *armA* was detected in only one sample of chicken feces, as occurred in chicken meat, but with a high abundance, only slightly lower than that of the β -lactamase genes (Fig. 3b).

Discussion

This study focuses on the prevalence of ARGs in bacteriophages, ubiquitous bacterial viruses that have been reported in diverse environments^{21,22,29–31}, in human²⁵ and animal feces²⁶, and more recently in vegetables and agricultural soils^{28,32}. Bacteriophages facilitate ARG transmission between bacteria, as transduction does not require direct contact between “donor” and “recipient” cells, although the transfer mechanism is not completely understood. Phages can transmit ARGs through generalized transduction, as reported for *Salmonella* phages in chicken meat³³ or in veterinary settings³⁴. Particles mobilizing ARGs can also be produced in temperate phages induced from bacterial strains²⁵, resulting in ARG transfer³⁵. Recently a new lateral transduction mechanism has been reported¹⁵, by which phages package and spread the bacterial chromosome at high frequencies.

Target gene	Reaction	Oligonucleotide	Sequence	Amplimer (bp)	LOQ (GC)	Reference
<i>bla_{TEM}</i>	PCR	UP	CTCACCCAGAAACGCTGGTG	569		21
		LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA			
	qPCR	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	7.6	65
		LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG			
		TaqMan TEM	6FAM-CCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ			
<i>bla_{CTX-M-1}</i> group	PCR	UP	ACGTAAACACCGCCATTCC	356		21
		LP	TCGGTGACGATTTAGCCGC			
	qPCR	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	8.4	21
		LP	ACATCGCGACGGCTTCT			
		TaqMan CTX-M-1	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ			
<i>bla_{CTX-M-9}</i> group	PCR	UP	ACGCTGAATACCGCCATT	352		26
		LP	CGATGATTCTCGCCGCTG			
	qPCR	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	13	26
		LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT			
		TaqMan CTX-M-9	6FAM - TCGTGCAGCCGCTG- MGBNFQ			
<i>bla_{OXA-48}</i>	PCR	UP	CGTTATGCGTGTATTAGCCTTAT	790		25
		LP	TTTTTCCTGTTTGAGCACTTCTTT			
	qPCR	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	18.2	25
		LP	TGGTTCGCCGTTTAAGATT			
		TaqMan OXA-48	6FAM-CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ			
<i>bla_{VIM}</i>	PCR	UP	TCTACATGACCGCTCTGTC	748		28
		LP	TGTGCTTTGACAACGTTTCGC			
	qPCR	UP	AATGGTCTCATTGTCCGTGATG	61	33.9	28
		LP	TCGCACCCACGCTGTA			
		TaqMan VIM	6FAM - TGATGAGTTGCTTTTGATTG- MGBNFQ			
<i>sul1</i>	PCR	UP	TTCATGGGCAAAAGCTTGATG	965		20,66
		LP	GGCCGGAAGGTGAATGCTA			
	qPCR	UP	CCGTGGCCTTCTGTAAAG	67	5.9	20
		LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT			
		TaqMan sul1	6FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ			
<i>mecA</i>	PCR	UP	GATAGCAGTTATATTCTA	434		21
		LP	ATACTTAGTTCTTTAGCGAT			
	qPCR	UP	CGCAACGTTCAATTAATTTGTAA	92	10.4	67
		LP	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA			
		TaqMan mecA	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA-MGBNFQ			
<i>qnrA</i>	PCR	UP	ACGCCAGGATTTGAGTGAC	565		46
		LP	CCAGGCACAGATCTTGAC			
	qPCR	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	8.6	46
		LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG			
		TaqMan qnrA	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ			
<i>qnrS</i>	PCR	UP	AAGTGATCTCACCTTACCCTTG	425		46
		LP	TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG			
	qPCR	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	8.3	46
		LP	GGCATTGTTGAAACTTGCA			
		TaqMan qnrS	6FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ			
<i>armA</i>	PCR	UP	CAAATGGATAAGAATGATGTT	774		63
		LP	TTATTTCTGAAATCCACT			
	qPCR	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT	94	33.4	24
		LP	GATTGAAGCCACAACCAAAATCT			
		TaqMan armA	6FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ			
16SrDNA	qPCR	338 F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	236		68
		518 R	ATTACCGCGGCTGCTGG			
pGEM	PCR	pGEM7up	TGTAATCAGACTCACTAT			Promega

Table 2. Oligonucleotides used in this study for PCR and qPCR assays targeting each ARG. For each assay, the amplimer length and the limit of quantification (LOQ) are indicated.

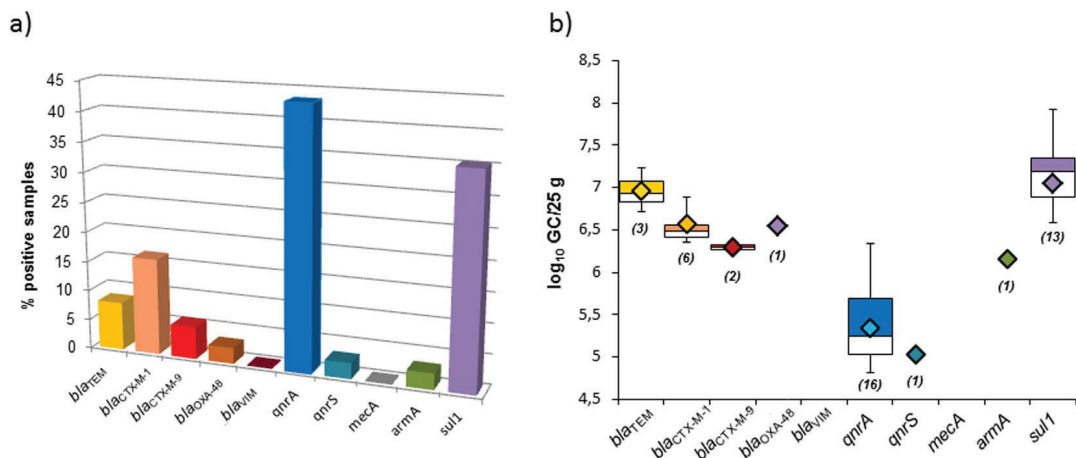


Figure 3. ARGs in phage particles in chicken feces. (a) Percentage of positive samples for each ARG in the fecal matrix. All the values represented are within the limit of quantification. (b) Abundance of each ARG in chicken feces represented in boxplots (\log_{10} GC/25 g). The diamond represents the average value of the positive samples, the colored upper squares include samples that present values within the 75th percentile, and in the lower white boxes the values are shown within the 25th percentile. The number of samples appears in brackets.

Regardless of the mechanism involved, the injection of the mobilized DNA into the recipient strain depends only on the phage capsid. On the other hand, the ability of the transducing particles to propagate in a host cell requires expression of the phage genes, and particles generated through generalized or lateral transduction only possess bacterial DNA. According with previous studies of our group^{21,25,28}, transducing particles containing only bacterial DNA (including ARG) are abundant. These results are in accordance with other authors that indicate that mostly bacteriophages, understood as phage capsids containing complete phage genomes, rarely carry antibiotic resistance genes³⁶. Instead, transducing particles containing bacterial DNA (including ARG) are not considered when analyzing phage genomes, and might be confounded with bacterial DNA contamination. In the current study however, at least a fraction of the phages were able to propagate, indicating that these were infectious and possessed phage genes in addition to the ARGs. Only one beef sample, in which *blaVIM*-containing particles were directly isolated, became negative after the enrichment culture. This case suggests the particles were unable to propagate and the ARG may have been lost after injection in the host cell without a subsequent generation of phage progeny. The infectiveness of the particles is an indication of their ability to attach the recipient cell and inject their DNA, the first steps required for transduction. Our attempts to detect transductants that acquired one of the ARGs were unsuccessful, but this limitation could be explained by several causes: the particles in the samples were able to propagate but not able to transduce the ARG; the recipient host did not possess the proper site to allow recombination of the ARG hence the frequency of transduction was too low to be detected; or even that other virulent phages in the samples propagated and killed the transductant cells before they were isolated, considering that the transducing particles might not generate superinfection immunity in the recipient cell³⁷. Probably some of the particles detected in the samples were infectious phages, this is phage capsids with a complete phage genome that incorporated the resistance gene.

The food industry has long been subject to a very strict regulation of various microbiological parameters. In minced meat the maximum values of *E. coli* established by the European Union are between 50 and 500 CFU/g³⁸. Our samples fulfilled the requirements and did not exceed these values, although their microbiota contained a significant population resistant to β -lactam antibiotics. The detected ARGs exhibited considerable heterogeneity in prevalence and/or abundance. Nevertheless, as indicated above, as the abundance is a consequence of the propagation steps, the densities obtained can only be considered as indicative.

All the samples contained *sul1* in densities of up to 10^{7-8} GC/25 g. This ubiquity may be explained by the frequent use of sulfonamides in veterinary medicine in the European Union^{39,40}. β -lactamase genes were also highly prevalent, again in accordance with current veterinary use⁴¹ and the pervasiveness of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in animal feces⁴²⁻⁴⁴ as well as the presence of ARGs in the phage DNA fraction in animal wastewater. Worthy of note is the detection of *blaOXA-48*, an emerging carbapenemase that hinders treatment with carbapenems. Besides its clinical significance, it has previously been detected chromosomally in bacteria from food-producing animals⁴⁵ and in DNA in phage particles isolated from agricultural settings²⁸. Quinolone-resistance genes, particularly *qnrA*, were prevalent in pork and beef and also present in chicken feces in moderate abundance, in agreement with observations in animal wastewater⁴⁶. Quinolones are frequently administered in cattle and swine⁴⁷, although their use in animals is restricted to the treatment of infections⁴⁸. *armA* was found in chicken meat and feces in moderate levels. It has previously been reported in *Salmonella* or *E. coli* from pigs and poultry, alone or in combination with other ARGs⁴⁹. Finally, the non-detection of *mecA* in our samples could be due to its absence, or to its relation to *Staphylococcus* sp.⁵⁰; phage particles containing *mecA* and generated from *Staphylococcus* might be unable to propagate in *E. coli* and therefore be undetectable.

Both ham and mortadella undergo thermal processing in their preparation, which largely eliminates microorganisms. Further, it is not ruled out that these products contain preservatives that prevent the growth of microorganisms. In spite of similar levels of culturable microbiota, ham showed more infective ARG-phage particles than mortadella. This could be due to an incorrect manipulation in the shop where it was bought, or perhaps because ham is more commonly consumed than mortadella and therefore suffers more manipulation in a single day. Taking into account that each sample was purchased in a different establishment, cross-contamination may be relatively common since at least one ARG was detected in phage particles in all samples.

The Joint Inter-agency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis Spain⁴⁷ estimated the antibiotic consumption by the most relevant animal producing species. The report shows that swine group most treated with β -lactam antibiotics and quinolones (58 and 60% respectively), partially explaining the prevalence and ARG abundance in pork and ham in this study, being cattle the second most treated group (27–28) followed by poultry (6–7%).

The chicken feces were found to contain ARG-packaging phage particles, as previously observed in human feces²⁵, which points towards feces as a source of the phage particles found in chicken meat. Intensive poultry production, one of the fastest growing industries in the world, greatly depends on antimicrobials to prevent and treat diseases. The prophylactic use of antibiotics is difficult to eradicate due to the fear of infections spreading through the chicken farms. However, such an intensive use of antibiotics implies a very high selective pressure and the promotion of resistance transfer events within the chicken microbiota⁵¹.

The most prevalent genes in the chicken fecal samples were *sulI* and *qnrA*. Sulfonamides and fluoroquinolones are strongly adsorbed to feces⁴⁰, persisting for a long time after excretion and elimination. The constant presence of antibiotics may select these resistances in the fecal microbiota, which are subsequently spread in phage particles. Thus, the fecal contamination in the samples, although low, could be the origin of the ARG-containing phage particles detected. The presence of fecal contamination in chicken meat is attributed to breeding conditions and the processing and handling of the meat before selling. When meat is crushed, microorganisms present on the surface can penetrate the whole product, so thorough cooking is vital before consumption⁵².

Antimicrobials are administered in livestock for preventive and/or therapeutic purposes, but they have also been used as growth promoters to increase the efficiency of animal production, a practice prohibited in Europe since 2006 (EC Regulation No. 1831/2003)⁵³. The selective pressure arising from this massive and indiscriminate use of antibiotics enhances the mobility of antibiotic resistance genes (ARGs) and the subsequent appearance of resistant bacteria⁵⁴. Moreover, phages persist to certain treatments used for the processing of food or water samples, such as chlorination, thermal treatment or high hydrostatic pressure (HHP)⁵⁵. Food additives such as EDTA or sodium citrate⁴⁶ may promote the induction of the lytic cycle of certain prophages that will be spread in the food matrix, in the environment or be ingested and reach the human gut, being able to transduce DNA⁵⁶.

At the moment there is no legislation to control antibiotic resistant bacteria or the ARGs and genetic elements that mobilize them. The official incorporation of phage detection methods as indicators is only beginning to be envisaged⁵⁷. Meanwhile, the detection of phages is not yet part of food safety practice, including that of phages potentially capable of transferring ARGs to the natural human microbiota as well as to pathogens.

The expansion of resistances will take the world into a post-antibiotic era, where many common and minor infections will again become life-threatening¹ unless urgent methods are taken.

Levels of ARGs in the samples were quite heterogeneous. The most striking result was the prevalence and abundance of *sulI* and β -lactamase genes, related with commonly used antibiotics in veterinary medicine, and the non-detection of *mecA*. The propagation experiments showed that part of the phage particles carrying ARGs were infective. Since infection is the first step in ARG transduction, this finding provides further evidence for the role of phage particles in the horizontal transmission of ARGs between bacteria, or between animals through cross-contamination, or to humans via the food chain.

In the absence of any type of food safety regulations aimed at monitoring bacteriophages, their consumption by the population constitutes a health risk factor. Hence, there is a need for further study of ARG transmission by phages through the food chain and the possible transfer of ARGs between commensal bacteria and pathogens.

Methods

Samples. The minced meat samples used were classified into 3 groups, pork, beef, and chicken, with 10 samples of each; the sliced meat analyzed consisted of 5 samples of ham and 5 of mortadella. All samples were purchased from local retailers in the area of Barcelona (Spain) during 2017–2018. All of them were considered to be fresh samples as they had not undergone any packaging or freezing process and were analyzed within 24 hours after purchase.

Thirty-seven archived samples of chicken feces (cecal contents) of broiler chickens from different flocks and farms from northeastern Spain were collected at the slaughterhouse in 2015 and stored at -20°C .

Twenty grams of each sample were homogenized in 60 ml of phage buffer, using the Stomacher homogenizer (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany) for 2 minutes. Stomacher bags with filters (Afora, Barcelona, Spain) were used to improve the separation of solid waste from the liquid fraction containing the microorganisms.

Bacterial and viral indicators. Total aerobic microorganisms and total aerobic microorganisms resistant to ampicillin (amp) in the homogenate were evaluated on Tryptone Soy agar (TSA) or TSA with amp (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C .

Total *Escherichia coli* and *E. coli* resistant to amp in the homogenates were determined on Chromocult[®] Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) or Chromocult[®] Coliform Agar with amp (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) respectively. Incubation was first performed for 2 hours at 37°C to adapt potentially damaged microorganisms and then overnight at 44°C . Ten percent of the blue colonies presumed to be *E. coli* were confirmed with the Indole test and grown in McConkey agar.

Somatic coliphages, proposed as viral indicators of fecal pollution⁵⁸, were evaluated to determine the presence of fecal viruses in the samples. Ten ml of homogenates obtained as above were centrifuged for 15 minutes at 4000×g and the supernatant was filtered through 0.22 µm low protein binding polyethersulfone membranes (PES) (Millex -GP, Millipore, Bedford, MA). Ten-fold dilutions of the filtrates were analyzed in duplicate for the presence of somatic coliphages following the ISO standard method⁵⁹ that uses *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) as the bacterial host. Plates were incubated at 37 °C for 18 h.

Each homogenate was analyzed for all the indicators in duplicate.

Chicken feces. Four g of feces were homogenized in 16 ml of phage buffer using a horizontal agitator at 800 rpm for 10 minutes and then centrifuged at 4000 ×g for 25 minutes. The supernatant was collected, and centrifugation was repeated under the same conditions. The final supernatant was filtered through 0.22 µm low protein binding polyethersulfone membranes (PES) (Millex -GP, Millipore, Bedford, MA) and used for the extraction of phage particles and DNA in the particles. In this case, microbial indicators were not analyzed, as these were archival samples kept at −20 °C since their collection in 2015.

Extraction of phage particles. One ml of the homogenate filtered as described above was treated with chloroform (1:10 (v/v)) to remove possible DNA carrier vesicles. Briefly, chloroform was added to the sample, which was vigorously vortexed for 5 minutes and centrifuged at 16000 ×g for 5 minutes. The supernatant was recovered and incubated with DNase (100 units/mL of the supernatant) to eliminate any free DNA present in the samples outside the phage particles. DNase was inactivated by heating for 5 minutes at 75 °C and an aliquot was taken as a control. These lysates were used for extraction of DNA in the phage particles or to evaluate the infectivity of the phage particles by propagation.

Controls were performed to confirm the removal of DNA by the DNase treatment and the correct inactivation of DNase by heat treatment. The procedure was done as described previously⁶⁰.

Extraction of DNA in the phage particles. The protocol for DNA extraction was as previously described⁶¹ with some modifications. After the treatment with chloroform and DNase, aliquots of 50 µl were stored at −20 °C as negative controls for the presence of non-encapsidated DNA. The extraction of DNA from the phage capsids was continued with the remaining phage suspension. To break the capsids and release the genetic material, the samples were treated with proteinase K (20 mg/ml) in 250 µl of proteinase K buffer and incubated for 1 h at 55 °C. Encapsidated DNA was extracted by phenol-chloroform (1:1) (v:v) treatment and the aqueous phase was again treated with chloroform (1:1) (v:v) by centrifuging at the same speed and time as in the previous step. The remaining phenol/chloroform was removed by adding the mixture to Phase Lock Gel Tubes (5- Prime, Huco Erlöss, Madrid, Spain) and centrifuging following the manufacturer's instructions. DNA was precipitated using 100% ethanol and 3M sodium acetate, and resuspended in 100 µl of ultrapure water. DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

Amplification of ARGs in DNA of phage particles. Quantitative real-time PCR (qPCR) using TaqMan hydrolysis probes was conducted with the StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) in a 20 µl reaction mixture with the TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems). The results were analyzed with the Applied Biosystems StepOne™ Instrument program.

Ten qPCR assays targeting ARGs were performed in 9 µl of the sample DNA or quantified plasmid DNA. The ARGs were selected from groups relevant in clinics, abundant in the environment, or that confer resistance to different antibiotic groups used in veterinary. These included β-lactamase genes that confer resistance to β-lactam antibiotics (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{VIM}), two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*), a gene conferring resistance to methicillin (*mecA*), commonly found in *Staphylococcus*^{21,46}, *sulI*, which confers resistance to sulfonamides and is frequently found in environmental and clinical bacterial populations⁶², and *armA*, which encodes aminoglycoside resistance and is widely distributed in *Enterobacteriaceae*⁶³.

For quantification, standards of known concentration containing a fragment of each ARG were prepared. Each ARG was amplified by conventional PCR, using an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) with the primers described in Table 2. The amplicons were purified and cloned into a pGEM-T Easy vector for insertion of PCR products (Promega, Barcelona, Spain). The correct cloning of the fragment in the vector was confirmed by PCR using primer pGEM7up (Table 2) and the construct was used to generate the standard curves as previously described²¹. The standards were also used as positive controls.

All samples were performed in triplicate (including the standards and negative controls). The number of gene copies (GC) was defined as the mean of the triplicate data obtained. To quantify the ARGs, we considered the GC results obtained within the threshold cycle (Ct) within the limit of quantification (LOQ).

Negative controls to exclude contamination with non-encapsidated DNA. To rule out contamination with DNA outside the phage particles (either bacterial or free DNA present in the samples), the aliquot of each sample taken after DNase treatment and before desencapsidation by proteinase K digestion, and kept at −20 °C, was screened by qPCR for each ARG and for bacterial 16S rDNA (Table 2). These controls were expected to be negative after the removal of all non-encapsidated DNA by the DNase. The ARGs were evaluated by qPCR assays as described above and in Table 2, and the absence of bacterial 16S rDNA was verified by qPCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and primers 338F/518R (Table 2).

Propagation cultures. Phage particles in the samples were propagated in enrichment cultures of the strain *E. coli* WG5 as a host bacterium. This strain, used for the somatic coliphage count, was selected because of its sensitivity to phage infection²⁸ and because it does not harbor any of the ARGs targeted in this study or any prophage⁶⁴.

To evaluate the infectivity of the phage particles carrying ARGs, the analysis of ARGs by qPCR was carried out both before (direct quantification from the sample) and after phage propagation in the enrichment cultures. As the chicken feces were archive samples and not expected to contain infectious phages, the propagation experiments were only conducted with phages in the meat samples. If phages carrying ARGs were able to infect and propagate on the host strain, the ARG levels would be expected to increase due to the higher concentration of phage particles. If ARG levels decreased, the particles would be considered incapable of propagating.

The propagation culture was prepared with one ml of phage particles after filtration and DNase treatment and one ml of *E. coli* WG5 at the exponential phase (OD₆₀₀ 0.3) in 8 ml of Luria-Bertrani broth (LB). This mixture was incubated for 18 h at 37 °C with shaking. After incubation, the phages were purified, and DNA in phage particles was extracted as indicated above.

References

- World Health Organization. Antibiotic resistance at, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (2018).
- Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T a peer-reviewed J. Formul. Manag.* **40**, 277–83 (2015).
- Baquero, F., Tedim, A. P. & Coque, T. M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* **4**, 15 (2013).
- Perron, G. G. *et al.* Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS One* **10**, 1–19 (2015).
- Allen, H. K. *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 251–9 (2010).
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B. & Bürgmann, H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* **81**, 45–55 (2015).
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Manoj, V. R. & Dong, R. Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Sci. Total Environ.* **541**, 8–22 (2016).
- Baquero, F., Martínez, J. L. & Canton, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 260–265 (2008).
- Von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
- Stanczak-Mrozek, K. I., Laing, K. G. & Lindsay, J. A. Resistance gene transfer: Induction of transducing phage by sub-inhibitory concentrations of antimicrobials is not correlated to induction of lytic phage. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 1624–1631 (2017).
- Spano, A. J. *et al.* *In vitro* assembly of a prohead-like structure of the Rhodobacter capsulatus gene transfer agent. *Virology* **364**, 95–102 (2007).
- Thierauf, A., Perez, G. & Maloy, A. S. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* **501**, 267–86 (2009).
- Thierauf, A., Perez, G. & Maloy, S. In *Bacteriophages Methods and Protocols* (eds Clokie, M. R. J. & Kropinski, A. M.) 267–286 (Humana Press, 2009).
- Chen, J. *et al.* Genome hypermobility by lateral transduction. *Science (80-)*. **362**, 207–212 (2018).
- Suttle, C. A. Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356–361 (2005).
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. & Brüßow, H. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 417–24 (2003).
- Romanowski, G., Lorenz, M. G., Sayler, G. & Wackernagel, W. Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3012–9 (1992).
- Zhu, B. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Res.* **40**, 3231–8 (2006).
- Calero-Cáceres, W. *et al.* Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* **48**, (2014).
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**, (2011).
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M. & Balcázar, J. L. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* **220**, 981–984 (2017).
- Balcázar, J. L. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* **10**, e1004219 (2014).
- Quirós, P. *et al.* Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 606–9 (2014).
- Brown-Jaque, M. *et al.* Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **51**, 434–442 (2018).
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J. & Muniesa, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4908–4911 (2011).
- Brown-Jaque, M. *et al.* Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Front. Microbiol.* **9**, 856 (2018).
- Larrañaga, O. *et al.* Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ. Int.* **115**, 133–141 (2018).
- Muniesa, M. *et al.* Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1134–7 (2004).
- Gunathilaka, G. U., Tahlan, V., Mafiz, A. I., Polur, M. & Zhang, Y. Phages in urban wastewater have the potential to disseminate antibiotic resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**, 678–683 (2017).
- Anand, T. *et al.* Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *J. Gen. Virol.* **97**, 3458–3466 (2016).
- Ross, J. & Topp, E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7905–13 (2015).
- Shousha, A. *et al.* Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4600–6 (2015).
- Hilbert, M., Csadek, I., Auer, U. & Hilbert, F. Antimicrobial resistance-transducing bacteriophages isolated from surfaces of equine surgery clinics – a pilot study. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **7**, 296–302 (2017).
- Lee, Y.-D. & Park, J.-H. Phage Conversion for Beta-Lactam Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus from Foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 263–269 (2016).
- Enault, F. *et al.* Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J.* **11**, 237–247 (2017).
- Bondy-Denomy, J. *et al.* Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J.* **10**, 2854–2866 (2016).
- Anonymous. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00012-7> (2005).

39. Garcia-Galan, M. & Díaz-Cruz, M. Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *TrAC Trends Anal. Chem.* **28**, 804–819 (2009).
40. Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* **8**, 1–13 (2008).
41. De Bryne, N., Atkinson, J., Pokludová, L. & Borriello, S. P. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* **175**, 325 (2014).
42. Mesa, R. J. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, (2006).
43. Coque, T. M., Baquero, F. & Canton, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* **13**, 19044 (2008).
44. European Commission. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). 1831/2003/EC* (2005).
45. Ceccarelli, D. *et al.* Chromosome-encoded bla_{OXA-48}-like variants in *Shewanella* spp. from food-producing animals, fish and the aquatic environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, AAC.01013–16 (2016).
46. Colomer-Lluch, M., Jofre, J. & Muniesa, M. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1265–1274 (2014).
47. Alonso, M. *et al.* Informe JIACRA Spain. Primer análisis integrado del consumo de antibióticos y su relación con la aparición de resistencia. *Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos*, at, http://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/field/files/informe_jiacra-espana.pdf?file=1&type=node&id=410&force=0 (2018).
48. Collignon, P. Fluoroquinolone use in food animals. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1789–90, author reply 1790–2 (2005).
49. Du, X.-D. *et al.* Tn1548-associated armA is co-located with qnrB2, aac(6′)-Ib-cr and blaCTX-M-3 on an IncFII plasmid in a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B strain isolated from chickens in China. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 246–248 (2012).
50. Köck, R. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* **15**, 19688 (2010).
51. Xiong, W. *et al.* Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* **6**, 34 (2018).
52. Lubber, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 21–8 (2009).
53. Hughes, P. & Heritage, J. In *Antibiotic growth promoters in food animals* (ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)) 129–152, at, <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/007/y5159e/y5159e05.pdf> (2004).
54. Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R. & McArthur, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–82 (2006).
55. Calero-Cáceres, W. & Muniesa, M. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res.* **95**, 11–8 (2016).
56. Tóth, I. *et al.* Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7242–7 (2003).
57. U.S. EPA. *2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water. EPA 823-F-16F001* (2016).
58. Jofre, J. In *Human Viruses in Water* (ed. Bosch, A.) **17**, 227–249 (Elsevier, 2007).
59. Anonymous. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 2: Enumeration of somatic coliphages (2000).
60. Colomer-Lluch, M. *et al.* Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* **73**, 167–75 (2014).
61. Sambrook, J. & Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY 999*. at, <http://books.google.com/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover&npapers2://publication/uuid/BBBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB> (2001).
62. Pruden, A., Arabi, M. & Storteboom, H. N. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 11541–9 (2012).
63. Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. & Lambert, T. Worldwide Disseminated armA Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2949–2953 (2005).
64. Imamovic, L. *et al.* Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain WG5. *Genome Announc.* **6**, (2018).
65. Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., Dirienzo, A. G., Cavanaugh, C. M. & Ford, T. E. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 203–11 (2009).
66. Heuer, H., Schmitt, H. & Smalla, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 236–43 (2011).
67. Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S. & Obst, U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* **56**, 277–86 (2004).
68. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–703 (1991).

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2016-75536-P), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European regional fund (ERF), the Generalitat de Catalunya (2017SGR170) and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRBa). CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya is also acknowledged. M.B.-J. has a grant from COLCIENCIAS (Republic of Colombia). P.B.-P. has a grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2017-081296). L.R.-R. is supported by the Beatriu de Pinós postdoctoral programme of the Government of Catalonia's Secretariat for Universities and Research of the Ministry of Economy and Knowledge.

Author Contributions

Conception and design: M.M. Acquisition of data: C.G.-G., P.B.-P., M.C.-C. Laboratory analysis: C.G.-G., M.B.-J., P.Q. Analysis and interpretation of data: M.M., L.R.-R., Drafting Manuscript: C.G.-G., M.M. Review of manuscript: L.R.-R., M.C.-C. and M.M.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

4.3. Capítulo 3:

El hígado de los pollos puede ser un reservorio de bacteriófagos y partículas fágicas con genes de resistencia a antibióticos

Chicken liver is a potential reservoir of bacteriophages and phage-derived particles containing antibiotic resistance genes

Pedro Blanco-Picazo, Clara Gómez-Gómez, Sergi Aguiló-Castillo, Dietmar Fernandez-Orth, Marta Cerdà-Cuéllar, Maite Muniesa y Lorena Rodríguez-Rubio

Microbial Biotechnology (2022); 1-12.

DOI: 10.1111/1751-7915.14056.

Introducción

La Unión Europea es uno de los principales productores avícolas, y se prevé un incremento en el consumo de carne de pollo a nivel mundial, al ser considerada por los consumidores como un producto barato, saludable y sostenible (OECD-FAO, 2018). La creciente demanda requiere de una producción más intensiva, creando una dependencia de agentes antimicrobianos en la prevención y tratamiento de enfermedades, aunque en muchos países (entre ellos España) esta producción está sometida a un uso responsable de antibióticos y a su utilización sólo cuando sean necesarios (Programa REDUCE pollos broiler | PRAN, 2020). Sin embargo, en muchos países del mundo, los antibióticos tienen un uso profiláctico, o incluso como promotores del crecimiento (uso prohibido en Europa y EE. UU.), siendo estas prácticas difíciles de eliminar debido al miedo a la propagación de infecciones en las granjas y la consecuente pérdida de la producción. El uso indiscriminado de antibióticos ejerce una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas (Xiong et al., 2018), incrementando la aparición de resistencias a antibióticos y con ello la movilidad de GRAs mediante elementos genéticos móviles (Frieri et al., 2017). Además, se ha descubierto que muchas bacterias patógenas o comensales aisladas de pollos codifican resistencias antimicrobianas (Nhung et al., 2017), que pueden ser transferidas a los humanos, tanto por contacto directo como indirecto, a través de los alimentos, el agua o el propio ambiente.

En los últimos años ha cogido fuerza el posible papel de los bacteriófagos y partículas fágicas en la movilización de resistencias, llegando a considerarse reservorios de GRAs en el ambiente (Blanco-Picazo et al., 2020; Quirós et al., 2014; Subirats et al., 2016). En muestras

clínicas como líquido ascítico y orina también se ha confirmado la presencia de partículas fágicas portadoras de GRAs (Brown-Jaque et al., 2016). Además, se ha visto que los bacteriófagos pueden ser capaces de translocarse desde el tracto intestinal hacia la cavidad peritoneal, sangre y otros órganos (Dąbrowska, 2019; Górski et al., 2006; Podlacha et al., 2021).

En el hígado de los pollos se ha demostrado la presencia de patógenos que han podido viajar a través de sistemas biliares, linfáticos o vasculares desde el tracto gastrointestinal, por lo que está reconocido como vehículo en la transmisión de infecciones a través de los alimentos (Lanier et al., 2018). La detección de patógenos en tejidos internos de hígados de pollo (Firlieyanti et al., 2016; Lanier et al., 2018), sumado a los estudios que demuestran que los fagos se encuentran en diferentes órganos (Kaźmierczak et al., 2021), entre ellos el hígado (Dąbrowska, 2019; Podlacha et al., 2021; Rusckowski et al., 2008), sugiere que las partículas fágicas portadoras de GRAs también podrían encontrarse en este órgano. Hasta la fecha, en pollos sólo se ha demostrado la presencia de partículas fágicas con GRAs en muestras cárnicas y heces (Gómez-Gómez et al., 2019).

Objetivos

En este trabajo se ha analizado la presencia de bacteriófagos en tejidos internos de hígados de pollo con el objetivo de obtener información sobre la diversidad de fagos de las muestras, realizándose una posterior comparativa de los viromas obtenidos de las muestras de hígados con viromas de heces de pollo para intentar establecer una posible conexión entre el tracto gastrointestinal y el hígado, ya que se sospecha que puede ocurrir una translocación de partículas fágicas. Además, se analizó la presencia de GRAs de especial relevancia (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *sul1*, *qnrA*, *armA* y *tetW*) en la fracción de ADN fágico de los hígados con la hipótesis de que las partículas fágicas juegan un papel importante en la transmisión y diseminación de resistencias entre bacterias, también en el hígado.

Resultados y Discusión

Se analizaron un total de 74 muestras de hígados de pollo, divididas en dos grupos: estériles (47 muestras) y no estériles (27 muestras). Al analizar indicadores microbianos, se obtuvo un elevado porcentaje de positivos en las muestras no estériles (Tabla 1). Para confirmar que los indicadores analizados pertenecían a los propios hígados y descartar una contaminación externa, se analizó el segundo grupo de hígados donde se tomó el tejido interno de los hígados en condiciones de máxima esterilidad (grupo estériles). En éstos se obtuvo un menor porcentaje de positivos para los indicadores analizados, aunque los valores medios obtenidos no fueron mucho menores que en hígados no estériles (Tabla 1), lo que sugiere que al menos una parte de los microorganismos detectados corresponden al propio hígado.

También se detectaron colifagos somáticos en ambos grupos (Tabla 1), demostrando la presencia de fagos infecciosos para *E. coli* en estas muestras. Además, se llevó a cabo una visualización por microscopía electrónica de los fagos presentes en los hígados estériles, observándose partículas fágicas con morfología tipo *Siphoviridae* (Fig. 1) y dos tipos de partículas diferentes, unas con una cola no contráctil recta (Fig. 1A) y otras con una cola no contráctil más corta y curvada (Fig. 1B).

Se detectaron diferentes GRAs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *sul1*, *qnrA*, *armA* y *tetW*) en la fracción de ADN fágico tanto en el grupo estéril como no estéril (Fig. 2). El porcentaje de positivos para todos los genes fue superior en el grupo de no estériles, a excepción del gen *bla*_{TEM}, que presentó un mayor número de positivos en las muestras estériles. El número de copias genómicas (CG) para los genes detectados oscilaba entre 10³ y 10⁶ CG /gramo, aunque no se obtuvieron valores que distaran significativamente ($P > 0.05$) entre ambos grupos (Fig. 3).

Con el objetivo de obtener más información, se realizó un análisis del viroma obtenido de un *pool* de muestras de hígado estériles, donde un 11% de *contigs* se identificaron como virales (Tabla 2), dentro de los cuales un 89% correspondía a bacteriófagos del orden *Caudovirales* (Fig. 4). El análisis morfológico mediante microscopía electrónica mostró fagos con una cápside icosaédrica y cola larga no contráctil, coincidiendo con la morfología de la familia *Shiioviridae* (Fig. 1). Además, la mayoría de bacteriófagos identificados en el viroma de los hígados mostraron homología con fagos de *E. coli* o *Shigella*, aunque este último resultado puede estar influenciado por el elevado número de secuencias de fagos de enterobacterias presentes en las bases de datos.

Aunque se demostró la presencia de GRAs mediante qPCR en la fracción de ADN fágico en las muestras de hígados, en el análisis metagenómico del mismo ADN no se detectó ningún GRA, seguramente debido a que se trata de una técnica menos sensible que la qPCR, incapaz de detectar los genes que se encuentran a menores concentraciones (Blanco-Picazo et al., 2020; Fernández-Orth et al., 2019). La detección de fagos (incluidos aquellos que contienen GRAs) capaces de infectar enterobacterias, especialmente *E. coli*, en el viroma de hígados sugiere que puede haber ocurrido una translocación desde el viroma intestinal (Brown-Jaque et al., 2016; Chen, Guo, et al., 2018; Górski et al., 2006). Para verificarlo, se analizaron dos viromas fecales de pollos (HP1 y HP2) (Tabla 2). Al igual que en el viroma de hígados, la mayoría de secuencias virales correspondían a bacteriófagos del orden *Caudovirales* (93% en HP1 y 88% en HP2) (Tabla S2). En los viromas fecales sí se detectó una gran diversidad de GRAs, sobre todo *bla*_{TEM} y *tetW* tanto en el análisis metagenómico como mediante qPCR (Tabla 3). Estos resultados coinciden con lo detectado mediante qPCR en muestras fecales de pollos (Gómez-Gómez et al., 2019) (Tabla 3), en viromas fecales humanos (Fernández-

Orth et al., 2019) y en viromas procedentes de ambientes con un alto grado de contaminación fecal (Chen et al., 2021; Colombo et al., 2016; Lekunberri et al., 2017a; Wang et al., 2021).

Finalmente, se realizó una comparativa entre las secuencias detectadas en el viroma de hígados de pollo (PL) y los viromas fecales (HP1 y HP2), obteniéndose coincidencias de un 89,7 % de especies presentes en PL y HP1, y un 97% entre PL y HP2 (Fig. 5, Tabla S3). Los resultados obtenidos sugieren el tracto gastrointestinal como un posible origen de los fagos encontrados en los hígados de pollo, pudiendo alcanzar este órgano tras un proceso de translocación. Estudios previos han demostrado que el hígado es uno de los órganos donde se produce una mayor acumulación de fagos. Sin embargo, a pesar de esta acumulación, surgen dudas de si realmente este órgano puede considerarse un reservorio de fagos, debido a que mediante estudios farmacocinéticos se ha visto que los fagos son rápidamente inactivados, al constituir el hígado uno de los principales responsables de la eliminación de bacteriófagos en circulación (Dąbrowska, 2019; van Belleghem et al., 2018). No obstante, la presencia de partículas fágicas infecciosas encontradas en tejidos internos de hígados de pollo podría explicarse atendiendo a que la eficiencia de la eliminación fágica y la tolerancia del sistema inmune depende de muchos factores, como el tipo de fago circulante, su tamaño, su concentración, o incluso el método de administración (Dąbrowska, 2019; Podlacha et al., 2021). Además, en condiciones de laboratorio, se han detectado fagos resistentes a macrófagos con capacidad de eludir el sistema de fagocitosis (Merril et al., 1996), lo que sugiere que también sería plausible que de forma natural se seleccionaran poblaciones fágicas capaces de sortear la degradación fagosomal.

Asumiendo que una fracción de bacteriófagos se acumulan en los tejidos internos del hígado durante un periodo de tiempo suficiente para inyectar su material genético si encuentran un huésped adecuado, si se tratan de partículas fágicas completas (con el genoma completo del fago), los fagos pueden ser capaces de propagar, y de transducir algunos de los genes que codifican (entre ellos GRAs). Por otra parte, si se tratan de partículas fágicas transductantes, entendidas como cápsidas fágicas que sólo contienen ADN bacteriano, pueden inyectar su ADN en la cepa huésped, y ésta adquirir los genes, siendo plausible la transferencia de GRAs en ambas condiciones.




Se ha demostrado que el hígado de pollos constituye un reservorio de *Campylobacter* y *Salmonella* (Firlieyanti et al., 2016; Laconi et al., 2021), así como de cepas patógenas de *E. coli* (Abdelhamid et al., 2020). Además, se ha visto que la colonización gastrointestinal de *Campylobacter* contribuye a la translocación de *E. coli* desde el intestino a otros órganos (Awad et al., 2016), pudiendo ser una de las causas de la prevalencia de *E. coli* encontrada en hígados. Al igual que las bacterias, los fagos también se translocan fácilmente a otros

órganos, actuando como reservorio de partículas fágicas que podrían llegar a transducir GRAs impulsando la aparición de bacterias resistentes.

Conclusiones

Un elevado porcentaje de muestras de hígado contienen GRAs en la fracción de ADN fágico, destacando como el más prevalente y abundante al gen *bla*_{TEM}. La coincidencia entre los viromas de hígados de pollo y los viromas de heces de pollo sugiere que los fagos, podrían translocar desde el tracto intestinal al hígado, pudiendo ser capaces de propagar y transducir su material genético (donde también hay GRAs), originando un nuevo reservorio de resistencias a antibióticos.

Chicken liver is a potential reservoir of bacteriophages and phage-derived particles containing antibiotic resistance genes

Pedro Blanco-Picazo,¹ Clara Gómez-Gómez,¹ Sergi Aguiló-Castillo,² Dietmar Fernández-Orth,³ Marta Cerdà-Cuellar,⁴  Maite Muniesa¹  and Lorena Rodríguez-Rubio^{1*} 

¹Department de Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, Planta 0, Barcelona, 08028, Spain.

²Spanish National Bioinformatics Institute (INB)/ELIXIR-ES, Barcelona Supercomputing Center, Barcelona, Spain.

³Department of Bioinformatics and Molecular Biology, Cerba Internacional Pl. Ramon Llull, 7-10, Sabadell, Barcelona, 08203, Spain.

⁴IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, 08193, Spain.

Summary

Poultry meat production is one of the most important agri-food industries in the world. The selective pressure exerted by widespread prophylactic or therapeutic use of antibiotics in intensive chicken farming favours the development of drug resistance in bacterial populations. Chicken liver, closely connected with the intestinal tract, has been directly involved in food-borne infections and found to be contaminated with pathogenic bacteria, including *Campylobacter* and *Salmonella*. In this study, 74 chicken livers, divided into sterile and non-sterile groups, were analysed, not only for microbial indicators but also for

the presence of phages and phage particles containing antibiotic resistance genes (ARGs). Both bacteria and phages were detected in liver tissues, including those dissected under sterile conditions. The phages were able to infect *Escherichia coli* and showed a Siphovirus morphology. The chicken livers contained from 10³ to 10⁶ phage particles per g, which carried a range of ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *sul1*, *qnrA*, *armA* and *tetW*) detected by qPCR. The presence of phages in chicken liver, mostly infecting *E. coli*, was confirmed by metagenomic analysis, although this technique was not sufficiently sensitive to identify ARGs. In addition, ARG-carrying phages were detected in chicken faeces by qPCR in a previous study of the group. Comparison of the viromes of faeces and liver showed a strong coincidence of species, which suggests that the phages found in the liver originate in faeces. These findings suggest that phages, like bacteria, can translocate from the gut to the liver, which may therefore constitute a potential reservoir of antibiotic resistance genes.

Introduction

The European Union (EU) is one of the world's largest producers of poultry meat and a net exporter of poultry products, with an annual production of around 13.4 million tonnes (Poultry | European Commission). Poultry is the only meat category whose production has expanded during the Covid-19 pandemic and the only one expected to grow between 2020 and 2030 in the EU (European Commission). The consumption of poultry meat is also projected to increase on a global scale (OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2018–2027), as it is regarded as a cheap, healthy and sustainable product by consumers.

Intensive poultry production, one of the fastest growing industries in the world, strongly depends on antimicrobials to prevent or treat diseases. In several countries, including Spain, the poultry production sectors are committed to a responsible use of antibiotics and are gradually reducing their application (Programa REDUCE Pollos Broiler | PRAN). Nevertheless, in other parts of the world, the usage of antibiotics as prophylactics, or even as growth promoters, a forbidden practice in the

Received 9 December, 2021; accepted 15 March, 2022.

For correspondence. *E-mail lorenarodriguez@ub.edu; Tel. +34934034625; Fax +34934039047.

Microbial Biotechnology (2022) 0(0), 1–12

doi:10.1111/1751-7915.14056

Funding information

This work was supported by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2016-75536-P and PID2020-113355GB-I00), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European regional fund (ERF). The study was partially supported by the Union Iberoamericana de Universidades (UIU-OHOW) and the Generalitat de Catalunya (2017SGR170). CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya is also acknowledged. P. B-P has a grant from the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2017-081296). L. R.-R is a lecturer of the Serra-Hünter program, Generalitat de Catalunya.

© 2022 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

EU and USA, is difficult to eradicate due to the fear of infections spreading through the poultry farms. The consequence of such an intensive use of antibiotics is a very high selective pressure on bacterial populations (Xiong *et al.*, 2018), which promotes mutations, the emergence of antibiotic resistances and the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) by mobile genetic elements (World Health Organization, 2018). Many pathogenic or commensal bacteria isolated from poultry encode antimicrobial resistances (Nhung *et al.*, 2017), which can be transmitted to humans by direct or indirect contact (e.g., through food, water and the environment). Multi-drug resistant bacteria arising from animal production practices have been found in everyday consumer products (Antimicrobial Resistance in the Environment Summary Report of an FAO Meeting of Experts FAO Antimicrobial Resistance Working Group, 2018).

Among the diverse elements that drive the mobilization of ARGs, the most extensively studied are plasmids and transposons (Brown-Jaque *et al.*, 2015). Recently, phages and phage-derived particles have been recognized as underestimated mobile genetic elements responsible for ARG transfer and as ARG reservoirs in the environment (Colomer-Lluch *et al.*, 2011a; Ross and Topp, 2015; Subirats *et al.*, 2016; Blanco-Picazo *et al.*, 2020). First discovered in the second decade of the 20th century (D'Herelle, 1917), phages have been receiving renewed attention for their role as regulators of bacterial populations in natural ecosystems (Fuhrman, 1999). Many metagenomic analyses of human and animal microbiomes have described the extremely high abundance of phages, generally greater than that of eukaryotic viruses (Breitbart *et al.*, 2003; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b; Minot *et al.*, 2011; Virgin, 2014). Phages have been reported in the lung, vaginal, skin, oral or intestinal microbiota (Oh *et al.*, 2014) and more recently, infectious phages have been found in clinical samples, such as ascitic fluids and urine (Brown-Jaque *et al.*, 2016). It has been shown that phages can translocate from the intestinal tract to the peritoneal cavity, bloodstream and other organs (Górski *et al.*, 2006; Dąbrowska, 2019; Podlacha *et al.*, 2021). In animals, phages infecting *Bacteroides* have been found in serum (Keller and Traub, 1974) and phages infecting *E. coli* O157 show good persistence in the circulatory system of mouse (Capparelli *et al.*, 2006). Also, phages translocate from blood to mouse foetal tissues in pregnant mice (Srivastava *et al.*, 2004) and from intestinal tract to blood in Goldfish (Kawato and Nakai, 2012).

Considering that phages are found in different systems and organs of the human and animal bodies (Dąbrowska, 2019; Kaźmierczak *et al.*, 2021; Podlacha *et al.*, 2021), and that those carrying ARGs have been

detected in different human systems (Brown-Jaque *et al.*, 2016; Blanco-Picazo *et al.*, 2020), ARG-carrying phages are also expected to occur in animal organs. In chickens, the largest source of meat intended for human consumption, the liver is of particular concern as it is closely connected with the gastrointestinal tract and has been identified as a vehicle for food-borne infection (Lanier *et al.*, 2018). Pathogens such as *Campylobacter* or *Salmonella* are thought to spread from the gastrointestinal tract to the liver through the biliary, lymphatic, or vascular systems (Lanier *et al.*, 2018). The ready detection of bacterial pathogens in internal tissues of chicken liver (Firleyanti *et al.*, 2016; Lanier *et al.*, 2018), and the numerous studies of the circulation of phages in different organs (Kaźmierczak *et al.*, 2021), including liver (Rusckowski *et al.*, 2008; Dąbrowska, 2019; Podlacha *et al.*, 2021) suggests that phages containing ARGs can also be present in the liver. To date, ARG-carrying phages in chicken have only been confirmed in meat samples and faeces (Gómez-Gómez *et al.*, 2019).

In this study, internal tissues of chicken liver samples were analysed for the presence of phages using a metagenomics approach and the liver virome was compared with that of faecal samples. Infectious phages were evaluated in the same liver samples. Finally, ARG-carrying phages in total liver and internal tissues were analysed by quantitative real-time PCR (qPCR).

Results and discussion

A high percentage of non-sterile liver samples contained moderate amounts of culturable microbial indicators (Table 1). To confirm that these indicators originated from the liver tissues and were not the result of contamination from the peritoneal cavity, a second set of livers were analysed in which the inner tissues were dissected under more strict sterile conditions, thus avoiding the potentially contaminated external parts. Although fewer sterile livers contained culturable microorganisms, when present, the average values were not remarkably lower (Table 1), suggesting that the detected bacteria and phages, at least partially, did not originate from external contamination. Somatic coliphages confirmed the presence of phages infectious for the *E. coli* WG5 strain.

Observation of phage particles in sterile liver samples

To confirm these results, total phage particles in sterile livers were monitored by TEM. As titres of at least 10^{7-8} PFU are necessary for phage detection by electron microscopy (Brown-Jaque *et al.*, 2016), a pool of phage suspensions from 10 livers were 100× concentrated as described in the methods section and used for TEM observation. Phage particles with icosahedral heads of

Table 1. Bacterial and viral indicators in the chicken liver samples.

Sample	Value	Somatic coliphages (PFU g ⁻¹)	Total aerobic bacteria (CFU g ⁻¹)	Ampicillin-resistant total aerobic bacteria (CFU g ⁻¹)
Non-sterile liver	<i>n</i>	47	47	47
	% Positive	66.0	100.0	95.0
	Average	2.6 × 10 ²	1.5 × 10 ⁴	2.1 × 10 ³
	Max–min	10 ³ –5	2.2 × 10 ⁵ – 4.2 × 10 ³	2.0 × 10 ³ – 5.0 × 10 ²
Sterile liver	<i>N</i>	27	27	27
	% Positive	60.6	96.4	67.9
	Average	2.2 × 10 ²	1.2 × 10 ⁴	1.5 × 10 ³
	Max–min	10 ³ –5	1.6 × 10 ⁵ – 5.0 × 10 ²	2.7 × 10 ³ – 5.0 × 10 ¹

57–62 nm and non-contractile tails were observed (Fig. 1). In the same pool, the visualized phages had long straight tails (Fig. 1A) as well as curly tails, suggesting that the concentrated samples contained at least two different types of phages (Fig. 1B). It should be noted that the concentration step and the requirement for high titres of phages for TEM observation (Blanco-Picazo *et al.*, 2020) may have reduced the diversity of observable phages to those reaching densities above 10^{7–8} PFU.

Presence of ARGs in the phage DNA fraction of chicken liver

Antibiotic resistance genes were detected in the phage DNA fraction of a large percentage of liver samples, with variable results for the five targeted ARGs (Fig. 2),

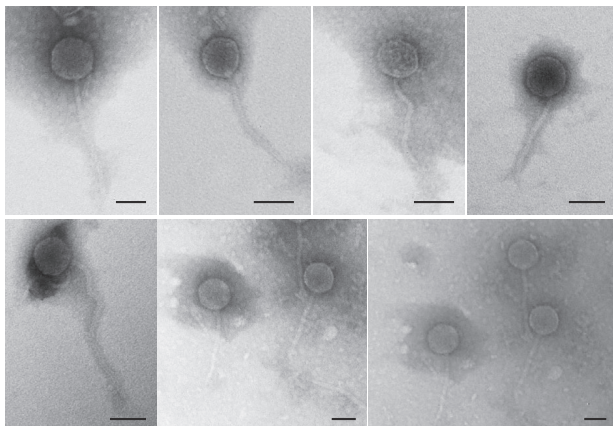
irrespective of whether the livers were sterile or not. Except for *bla*_{TEM}, ARG prevalence was lower in the viral fraction of sterile (Fig. 2) versus non-sterile liver. *qnrA* was only detected in sterile liver, and only in one sample (*qnrA* is not included in Fig. 3). This single positive does not allow conclusions to be drawn about the prevalence of *qnrA* in the two groups.

Antibiotic resistance gene abundance (Fig. 3) did not differ significantly ($P > 0.05$) between sterile and non-sterile livers. In non-sterile liver, there were no significant differences ($P > 0.05$) between the abundances of the different ARGs. In the sterile liver, the abundance of *bla*_{CTX-M-1} showed significant ($P < 0.05$) differences when compared with *armA*, *sul1*, or *tetW*, respectively. As *qnrA* was only detected in one sterile liver sample, it was not included in the chart. 3.07 log₁₀ of *qnrA* gene copies were detected per g of liver.

Liver and faecal viromes

The viromes of a pool of sterile liver samples were analysed to gain more insight into the phage fraction. The purification of encapsidated DNA to achieve the quality required for metagenomics resulted in the generation of a relatively low amount of contigs; 62% of the sequences were unclassified when compared against general databases, and did not correspond to eukaryotic, archaeal or bacterial DNA, while the rest of contigs were identified as bacterial (28%) and viral (11%) (Table 2). The great majority of viral sequences (89%) corresponded to bacteriophages of the Caudovirales order, particularly of the *Drexlerviridae* family (Fig. 4), which comprises phages with an icosahedral head and long non-contractile tail, compatible with the TEM

(A)



(B)

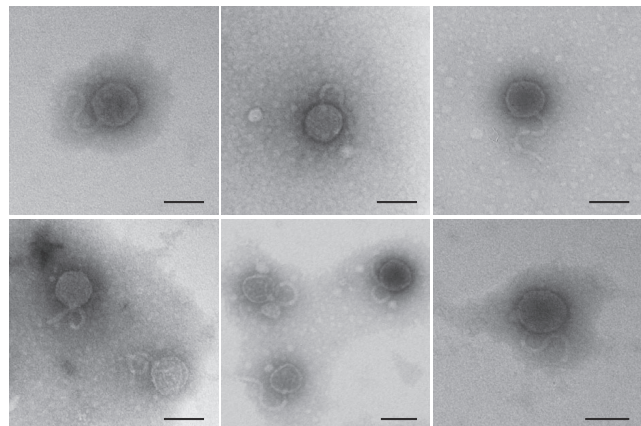


Fig. 1. Transmission electron micrographs of phages purified from a pool of 10 chicken liver samples from group 2 (sterile inner tissue). Two morphologies were observed: phages with icosahedral capsids and a long non-contractile tail (A) or a short and curly non-contractile tail (B). Bar 50 nm.

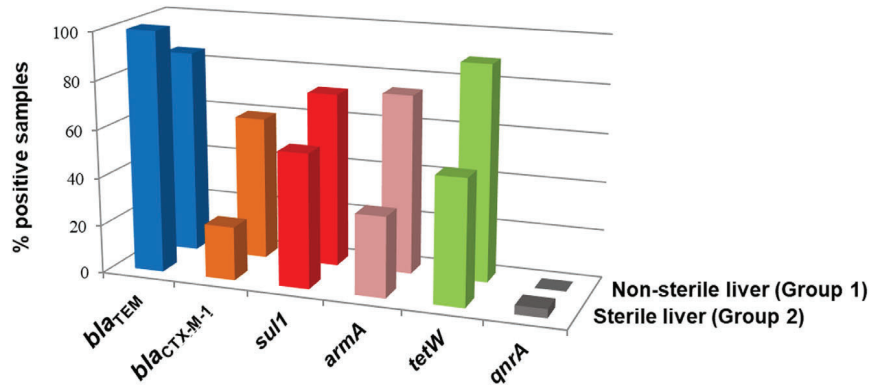


Fig. 2. Antibiotic resistance genes (ARGs) in the phage DNA fraction of chicken liver samples. Percentage of positive samples for each ARG (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *sul1*, *armA* and *tetW*) in each matrix. Two types of samples were analysed; group 1: the whole liver (non-sterile) and group 2: inner tissues of the liver (sterile), recovered by dissection with a sterile scalpel.

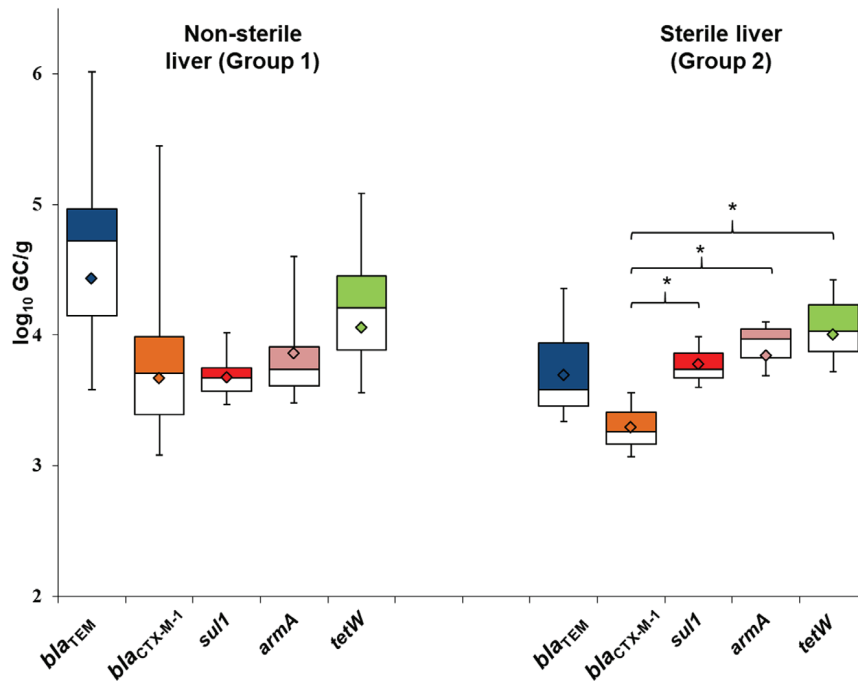


Fig. 3. Abundance of each antibiotic resistance gene (ARG) in phage DNA isolated from chicken liver samples of group 1: non-sterile (47 samples) and group 2: sterile (27 samples). Box plot of the average values (\log_{10} GC g^{-1} sample) of all ARGs in the positive samples. The cross-pieces of each box represent (from top to bottom) the maximum, upper-quartile, median, lower quartile, and minimum values. The diamond (black) shows the mean value. The upper boxes (white) in the box plot include samples showing values within the 75th percentile and lower box samples (grey) show values within the 25th percentile.

observations (Fig. 1). Most phages in the liver virome showed homology with *E. coli* or *Shigella* phages, although the high number of sequences of Enterobacteria phages, particularly those of *E. coli*, in the databases may have influenced this result. Considering the widespread genome mosaicism reported in phages (Hatfull, 2008), those infecting Enterobacteria should share several DNA fragments. The non-phage viral sequences

corresponded to gyroviruses (5%) and avian adeno-associated viruses (6%) (Fig. 4).

Although phage presence in the analysed samples was confirmed and ARGs were detected in the packaged DNA by qPCR, metagenomic sequencing of the same DNA was of insufficient depth to identify any ARGs. Less sensitive than qPCR, metagenomics cannot determine genes present in moderate concentrations,

Table 2. Metagenomic parameters in chicken liver and chicken faecal samples.

Origin	#contigs/Total length (bp)	Size of the longer contigs (bp)	#contigs Unclassified (%)	#contigs Archaea (%)	#contigs Bacteria (%)	#contigs Viruses (%)
Chicken liver (PL)	11 539 / 164 020	1646	7121 (61.71)	5.8 (0.05)	3196 (27.70)	1216 (10.54)
Chicken faeces (HP1)	643 753 / 295 827 925	110 470	535 005 (83.11)	329 (0.05)	105 241 (16.35)	2638 (0.41)
Chicken faeces (HP2)	1 163 538 / 558 526 824	237 483	954 610 (82.04)	611 (0.05)	204 160 (17.55)	3282 (0.28)

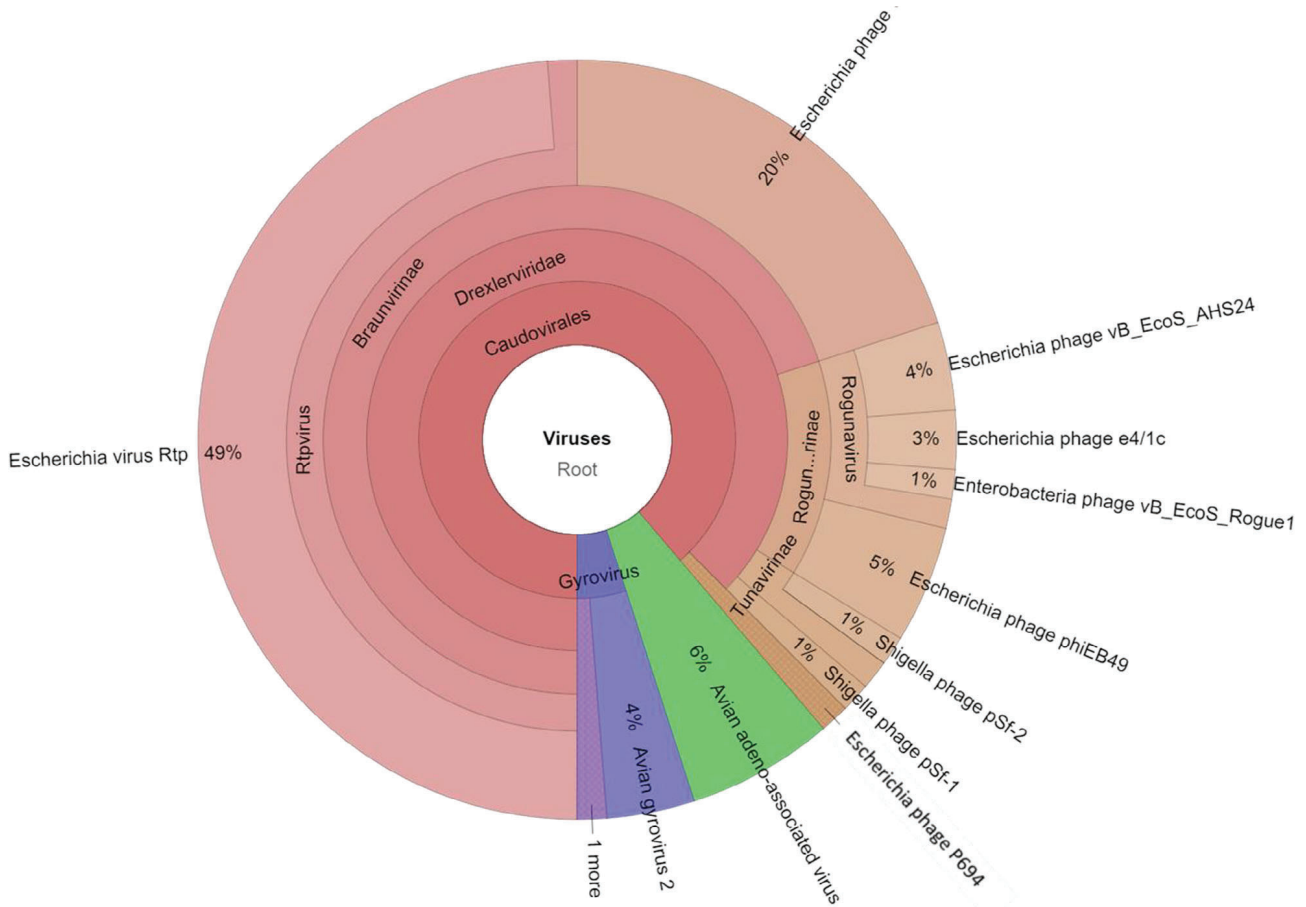


Fig. 4. Pie graphs showing the diversity of the viral fraction of chicken liver samples according to Kraken classification of metagenomics data. The graphs compare the distribution and relative abundance of viruses identified in the viromes with regard to the total viral sequences identified. Interactive pie graphs are available upon request.

such as ARGs, particularly in complex samples (e.g., liver, food and faeces) (Fernández-Orth *et al.*, 2019; Blanco-Picazo *et al.*, 2020). On the other hand, not being limited to specific genes, metagenomics can identify a more extensive repertoire of ARGs. It should also be mentioned that the successful elimination of all traces of non-packaged DNA, which required additional steps in the protocol, was achieved at the cost of reducing the recovery and quality of the extracted DNA.

The presence of phages (including those carrying ARGs) infectious for Enterobacteria, particularly *E. coli*,

in the liver virome suggests a translocation from the intestinal virome (Górski *et al.*, 2006; Brown-Jaque *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018). To gain further information, two chicken faecal viromes were analysed using the same protocol for phage purification and DNA extraction. The first finding was that the faecal virome contained a significantly higher amount of DNA, and consequently more sequences, compared with the liver virome (Table 2). However, a higher percentage of sequences remained unclassified, and a lower percentage were identified as viral (Table 2). Within the viral fraction, most

bacteriophages were of the Caudovirales order (93% in HP1 and 88% in HP2) (Table S2).

A great diversity of ARGs was detected in the viromes of chicken faeces in accordance with the qPCR results obtained in the previous studies (Gómez-Gómez *et al.*, 2019) (Table 3) and in accordance with the high amount of ARGs in the faecal virome of humans (Fernández-Orth *et al.*, 2019) and viromes of faecally polluted environments (Colombo *et al.*, 2016; Lekunberri *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Only two ARGs were detected by both the metagenomic analysis (using either Prokka, CARD or Resfinder) and qPCR, *bla*_{TEM} and *tetW*, which were the most abundant (more than 6 and 8 log₁₀ GC/g, respectively) (Table 3) according to the qPCR results. The other ARGs targeted by qPCR went undetected by the metagenomic approach, regardless of the bioinformatic platform used.

Several ARGs other than those targeted by qPCR were determined in the faecal viromes, conferring resistances to a range of antibiotics (e.g., chloramphenicol, macrolides, lincosamide and vancomycin) (Table 3). Resfinder, a more restrictive database, gave fewer results than Prokka or CARD, which also identified

transporters. Since ABC transporters confer unspecific resistance to drugs, and cannot be classified as ARGs, they have not been included in these results despite they can be horizontally mobilized, either by phage particles or by plasmids (Kadlec and Schwarz, 2009).

The viromes show a large set of bacterial sequences. Since the controls used have discarded that bacterial DNA contamination might have contributed significantly to these results, our assumption supported by previous studies (Fernández-Orth *et al.*, 2019; Fillo-Salom *et al.*, 2021; Humphrey *et al.*, 2021) is that phages package bacterial DNA from their hosts more frequently than previously thought. This information, together with the sequences of viral species, can then be used to determine the route of transmission of these phages. Since we speculate that phages can come from faecal microbiomes, we searched for coincidences between the chicken liver virome (PL) and two different faecal viromes (HP1 and HP2). When comparing bacterial and viral species detected in the liver virome with those detected in the faecal viromes, 61 of the 68 (89.7%) species found in the PL virome were also present in HP1 (Fig. 5, Table S3). The seven absent organisms were

Table 3. ARGs in chicken faeces detected by metagenomics compared with the ARGs detected by qPCR.

METAGENOMICS		qPCR			
	Gene	Resistance to	Average (log GC g ⁻¹)	Resistance to	
HP1	<i>tetM</i> (1-2) ^a , <i>tet32</i> , <i>tet40</i> , <i>tetW</i> <i>bla</i>_{TEM}	Tetracycline Betalactamics	<i>tetW</i> (8.55) <i>bla</i>_{TEM} (6.33) <i>bla</i> _{CTX-M-1} (5.20) <i>armA</i> (3.54) <i>qnrA</i> (3.63) <i>su1</i> (5.59)	Tetracycline Betalactamics	
	<i>ant</i> (6)-Ia, <i>aph</i> (2'')-Ilg, <i>aph</i> (3')-III, <i>aac</i> (6')-Im	Aminoglycoside		Aminoglycoside	
	<i>drxA</i> (2-15)	Daunorubicin/doxorubicin		Quinolone	
	<i>linA</i>	Lincosamide		Sulphonamide	
	<i>mecl</i> (1-3)	Methicillin			
	<i>mupB</i>	Mupirocin			
	<i>vanA</i> (1-2), <i>vanB</i> (1-3), <i>vanC</i> (1-2)	Vancomycin A, B, C-type			
	<i>lnuC</i>	Lyncomycin			
	<i>cfiC</i>	Linezolid			
	<i>ermB</i>	Macrolide			
	<i>cat</i>	Chloramphenicol			
	HP2	<i>tet32</i> (1-2), <i>tetM</i> (1-3), <i>tetO</i> , <i>tetW</i> <i>bla</i>_{TEM}	Tetracycline Betalactamics	<i>tetW</i> (8.00) <i>bla</i>_{TEM} (6.64) <i>bla</i> _{CTX-M-1} (5.12) <i>armA</i> (4.76) <i>su1</i> (5.85) <i>qnrA</i> (4.10)	Tetracycline Betalactamics
		<i>aph</i> (2'')-Ilg, <i>ant</i> (6)-Ia, <i>aph</i> (3')-III, <i>aac</i> (6')-Im	Aminoglycoside		Aminoglycoside
<i>ble</i>		Bleomycin		Sulfonamide	
<i>drxA</i> (1-34)		Daunorubicin/doxorubicin		Quinolone	
<i>cat</i>		Chloramphenicol			
<i>cfiC</i>		Linezolid			
<i>ermB</i> , <i>mefA</i> , <i>ermG</i>		Erythromycin			
<i>lnuC</i>		Lyncomycin			
<i>fsr</i>		Fosmidomycin			
<i>linA</i> (1-2)		Lincosamide			
<i>mecl</i> (1-16)		Methicillin			
<i>mupA</i> , <i>mupB</i> (1-2)		Isoleucine--tRNA ligase. Mupirocin			
<i>tmrB</i> (1-2)		Tunicamycin			
<i>vanA</i> (1-13), <i>vanB</i> (1-6), <i>vanC</i> (1-8), <i>vanW</i> (1-8)		Vancomycin A, B and C-type			

In bold, ARGs detected in the virome by metagenomics (either by Prokka or Resfinder) as well as by qPCR

a. In brackets are indicated the range of gene subtypes.

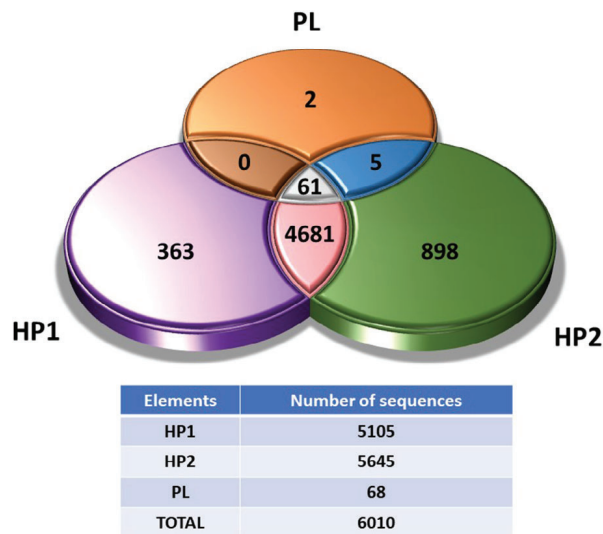


Fig. 5. Venn diagram showing the number of unique and sharing sequences between the chicken liver virome (PL) and the chicken faecal viromes HP1 or HP2 respectively.

Cloacibacterium normanense, Rogunavirus, Rtpvirus, *Escherichia* phage vB_EcoS_AHS24, Enterobacteria phage vB_EcoS_Rogue1, avian gyrovirus 2 and chicken anaemia virus. Similar results were observed when comparing the PL virome with HP2 (Fig. 5, Table S3), with 97% of the species (66 of the 68) in chicken liver being found in the faecal virome, only avian gyrovirus 2 and chicken anaemia virus being absent.

The high proportion of species in chicken liver virome matching those found in the faecal viromes (Fig. 5) points towards an intestinal origin of the viruses found in the chicken liver. It should be noted that although livers and faecal samples come from the same farm and type of chicken, samples were taken at different times, making the coincidence even more relevant. Translocation from the intestinal tract seems more likely than phages reaching the liver through systemic colonization. High accumulation of phages in liver tissues have been previously demonstrated (Dąbrowska, 2019; Van Belleghem *et al.*, 2019; Kaźmierczak *et al.*, 2021; Podlacha *et al.*, 2021). However, pharmacokinetics studies suggest that although phages accumulate very efficiently in the liver, they are also quickly inactivated because liver is the first responsible of bacteriophage clearance (Dąbrowska, 2019; Van Belleghem *et al.*, 2019), particularly by the macrophages found in the Kupffer cells (Inchley, 1969). Therefore, doubts arise whether the liver could be a reservoir of phages able to transduce ARGs to active recipient cells, despite the high accumulation. Noteworthy is the fact that the removal of phages in liver has been evaluated using phage suspensions, usually of a single phage type administered in animal models and not using

resident phages. Mutant phages able to circumvent the mononuclear phagocyte system have been reported (Merril *et al.*, 1996); therefore, if phages resistant to macrophages can be selected under laboratory conditions, it is plausible that natural subpopulations of phages with natural resistance to phagosomal degradation can be selected as well. In addition, the efficiency of the circulating phages removal and the tolerance of the immune system depend on many variables, such as the type of phages, the size of the virions, the amount of phages and even the administration method, if any (Dąbrowska, 2019; Podlacha *et al.*, 2021). All this together could explain the presence of infectious phages in the livers analysed in this study.

Assuming that a fraction of the phage population could be retained within the inner tissues of the liver for a long enough period of time to inject their DNA if a suitable host is found, what happens next will depend on whether the phages are complete (with the entire phage genome in the capsid) or transducing particles (phage capsids containing only bacterial DNA). Phages can propagate in the host strain and transduce some of the genes they encode (including ARGs), whereas transducing particles can inject their DNA in a recipient cell, which can acquire the genes through recombination. ARG transfer to a suitable host is possible in both scenarios. Administering a strong antibiotic treatment to an animal colonized by bacteria transduced by an ARG-carrying phage would impose strong selective pressure in favour of the transduced strains.

Chicken liver is a reservoir of *Campylobacter* and *Salmonella* (Firlieyanti *et al.*, 2016; Lanier *et al.*, 2018; Laconi *et al.*, 2021) and also of avian pathogenic *E. coli* (Abdelhamid *et al.*, 2020). Moreover, *Campylobacter* gastrointestinal colonization in chickens seems to contribute to the translocation of *E. coli* from the gut to extra-intestinal organs, leading to a high prevalence of *E. coli* in the spleen and liver (Awad *et al.*, 2016). Like their bacterial hosts, phages might easily translocate outside the intestinal environment to other organs, which can serve as reservoirs of phage particles and their genetic content and constitute environments for the emergence of new resistant strains.

Experimental procedures

This study did not include animal experimentation. Animal liver samples were collected at the slaughterhouse at the time of sacrifice following the guidelines of the Ethical Committee for Animal Experimentation (CEEA), the authorized body by the Catalan Government. The guidelines are defined in European Parliament 2010/63/EU; RD 53/2013; Directive 2010/63/UE; Decret 214/1997/GC, Ordre ECC/566/2015 and regulate the use of animals for

experimentation and other scientific purposes. All experimental procedures were conducted in accordance with the biosafety regulations for microorganisms and approved by the Office of Safety, Health and the Environment (OSSMA) of the University of Barcelona.

Samples

Sampling was performed in two slaughterhouses from northeastern Spain between February and September 2020. Healthy animals with no prophylactic antibiotic treatment were randomly selected. During the evisceration process, a first group of livers was collected from carcasses. Whole livers were removed aseptically using clean gloves and ethanol-disinfected scissors and placed in new, clean plastic bags. The livers of three carcasses per flock were pooled and analysed as a single sample. These correspond to group 1 comprising 47 whole liver samples.

However, after the analysis of culturable microorganisms, the high levels of bacteria and phages detected raised doubts about possible contamination from the peritoneal cavity. Therefore, a second group of samples was collected for this study (group 2). Group 2 comprised 27 internal liver tissue samples, each sample is a pool of three internal liver tissues from the same flock. To sample internal tissues, livers were placed on a sterile Petri dish and external parts of the liver were sanitized by searing the surface with a permanent cautery spatula. Then, sterile scissors and tweezers were used to remove the upper external segment of the liver and to collect fragments of the internal tissue, avoiding contact with the external surface of the liver even if it was previously sanitized.

In addition, archive samples of chicken faeces (caecal contents) of broiler chickens from different flocks and farms in northeastern Spain collected from a slaughterhouse in 2015 and stored at -20°C were used to analyse the chicken faecal viromes.

Homogenization of the liver samples

Ten grams of liver samples (requiring three livers from chickens of the same batch and farm) of Group 1 and 2 were homogenized in 40 ml of phage buffer. Tissues were disrupted using 1 and 3 mm glass beads (Hecht Assistant[®], Sondheim vor der Rhön, Germany) following the manufacturer's instructions and the homogenates were recovered.

At this point, the homogenates were used for the analysis of bacterial indicators, as described below. Subsequently, the homogenates were centrifuged at 4000 *g* for 25 min. The supernatant was collected and centrifugation was repeated under the same conditions. The final

supernatant was filtered through 0.22 μm low protein-binding polyethersulfone membranes (PES) (Millex -GP, Millipore, Bedford, MA). The filtrates were used for the analysis of somatic coliphages and the extraction of viral DNA.

Culturable bacterial and viral indicators

Two groups of culturable indicators were analysed in the liver samples from groups 1 and 2. Total aerobic microorganisms and ampicillin (amp)-resistant total aerobic microorganisms were evaluated in the homogenate of the livers for the presence of culturable bacteria. To do this, the homogenates were diluted 1/10 and 1/100. 0.1 ml of the homogenate or the dilutions were plated on Tryptone Soy agar (TSA) and TSA with amp ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and incubated at 37°C . Each homogenate was analysed in duplicate.

Somatic coliphages, proposed as viral indicators of faecal pollution (Jofre, 2007), were evaluated for the presence of infectious faecal viruses in the samples. To do this, 10 ml of homogenates were centrifuged for 15 min at 4000 *g* and the supernatants were filtered through 0.22 μm low protein-binding polyethersulfone membranes (PES) (Millex -GP, Millipore, Bedford, MA). Decimal dilutions of the filtrates were performed and 1 ml of each was analysed by double agar layer in duplicate for the presence of somatic coliphages following the ISO standard method (Anonymous, 2000) that uses *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) as the bacterial host. Plates were incubated at 37°C for 18 h. Each homogenate was analysed in duplicate.

Extraction of phage particles and removal of non-packaged DNA

To extract the DNA of viral particles in the sample, regardless they were infective or not, the homogenates obtained as described above were treated with chloroform (1:10 (v/v)) to remove any extracellular vesicles. The samples were vortexed for 5 min and centrifuged at 16 000 *g* for 5 min. The supernatant was recovered and digested with DNase ($100 \text{ units ml}^{-1}$ of the supernatant) to eliminate any DNA that might be present in the samples outside the phage particles. DNase was inactivated by heating for 5 min at 75°C and an aliquot was taken as a control to verify the removal of non-packaged DNA by qPCR amplification of bacterial *16S rRNA* and ARGs as described below. Additional controls were performed to confirm the correct inactivation of DNase by heat treatment, as described previously (Colomer-Lluch *et al.*, 2014).

Once the control was confirmed as negative, lysates were used to observe phage particles by electron

microscopy and to extract the DNA in the phage particles (packaged DNA).

Transmission electron microscopy

Viruses from the homogenates of liver samples of group 2 were purified by filtration, treated with chloroform as described above and 100× concentrated by protein concentrators (100-kDa Amicon Ultra centrifugal filter units; Millipore, Bedford, MA). Seven microlitres of the concentrated phage suspension was dropped onto copper grids with carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. Phages were visualized using a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA, USA) operating at 80 kV.

Extraction of packaged DNA for ARG quantification

The protocol for DNA extraction was as previously described (Sambrook and Russell, 2001) with some modifications. After performing the chloroform and DNase treatments and obtaining negative results for ARGs and *16S rRNA* amplification, which ruled out the presence of non-encapsidated DNA, capsids of the viral suspensions were degraded with proteinase K (20 mg ml⁻¹) in 250 µl of proteinase K buffer and incubated for 1 h at 55°C. Packaged DNA was then extracted by the phenol–chloroform (1:1) (v:v) method and the aqueous phase was again treated with chloroform (1:1) (v:v), centrifuging at the same speed and time as in the previous step. The remaining phenol/chloroform was removed by placing the mixture in Phase Lock Gel Tubes (5-Prime, Hucoa Erlöss, Madrid, Spain) for centrifugation following the manufacturer's instructions. DNA was precipitated using 100% ethanol and 3 M sodium acetate and resuspended in a final volume of 100 µl of ultrapure water.

qPCR analysis

The ARGs were evaluated by qPCR TaqMan assays (Table S1). The absence of bacterial *16S rRNA* was verified by qPCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Table S1).

qPCR using TaqMan hydrolysis probes was conducted with the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) in a 20 µl reaction mixture with the TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems). The results were analysed with the Applied Biosystems StepOne™ Instrument program.

Six qPCR assays targeting ARGs were performed in 9 µl of the sample DNA or quantified DNA. The targets were clinically relevant genes that confer resistance to β-

lactam antibiotics (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group), a quinolone resistance gene (*qnrA*), *sul1*, which confers resistance to sulphonamides and is frequently found in environmental and clinical bacterial populations (Pruden *et al.*, 2012), *armA*, which encodes aminoglycoside resistance and is widely distributed in *Enterobacteriaceae* (Galimand *et al.*, 2005), and *tetW*, conferring resistance to tetracycline, an antibiotic commonly used in intensive poultry farming (Mehdi *et al.*, 2018).

For quantification, serial dilutions of gBlocks™ Gene Fragments (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) of known concentration were used to generate the standard curves. All samples were run in triplicate (including the standards and negative controls). The number of gene copies (GC) was defined as the mean of the triplicate data obtained. To quantify the ARGs, we considered the results obtained within the threshold cycle (Ct) and within the limit of quantification (LOQ). This was determined by the last valid Ct for each ARG assay (GC µl⁻¹ are shown in Table S1) in the standard curve that was consistent in the diverse replicates. gBlocks were also used as positive controls.

Metagenomic analysis

Ten liver samples from group 2 (10 g) were pooled and used for sequencing the viral fraction (Virome PL). Chicken faecal samples were divided into two pools (chicken faeces HP1 and HP2). For each pool of liver or faeces, 10 g was homogenized together in 40 ml of phage buffer using a horizontal agitator at 800 rpm for 10 min. Viruses were recovered from the samples after filtration, chloroform and DNase treatment as described above. Before breaking the capsids, the removal of non-packaged DNA was confirmed by qPCR amplification of bacterial *16S rRNA* as a control.

The use of phenol in the DNA extraction protocol described above meant that the DNA quality was insufficient for metagenomic analysis, as previously reported (Fernández-Orth *et al.*, 2019). Therefore, the phage lysates were used to extract the DNA for metagenomic analysis using the QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Hilden, Germany), which broke down the capsids and allowed the viral DNA to be recovered in a final volume of 80 µl of bidistilled water. The DNA from the samples was pooled and further purified using the DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research, Irving, CA, USA) to a final volume of 50 µl, which contained the required DNA concentration for subsequent sequencing analysis.

Sequencing

The DNA concentration for metagenomics was evaluated using a Qubit® Fluorometer (Life Technologies, CA,

USA) and the DNA quality was further confirmed using the 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, CA, USA). 0.2 ng μl^{-1} of DNA was used to prepare the libraries. The DNA was fragmented and used to prepare the libraries with the Nextera XT Kit (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) protocol for paired-end libraries (2×150 bp). For extension, 14 PCR cycles of 2.5 min were performed to increase the tagmentation process. Libraries were purified using AmPure beads (Beckman Coulter Inc., California, USA), checked for the distribution and size of the fragments in a 2100 Bioanalyzer and the Agilent High Sensitivity DNA Chip (DNA 1000) (Agilent Technologies, CA, USA) and quantified in a Quantus™ Fluorometer (Promega, WI, USA). An equimolar pool of the seven samples was sequenced in a NextSeq Illumina in a High Output run of 300 cycles.

Bioinformatic analysis

Reads were analysed with FastQC (version 0.11.9) and summarized with MultiQC (version 1.11). As the files showed low sequence quality, high duplication levels, overrepresented sequences and the presence of adapters, a preprocessing step was performed. First, the duplications for each file were removed with Seqkit (v0.16.1). Then, the adapters for the paired-end files were cut with Trimmomatic (v0.39). Finally, the remaining duplicates and the sequences with quality below 20 for the paired-end files were removed with PRINSEQ (v0.20.4).

Reads were *de novo* assembled with SPAdes (version 3.15.3), specifically MetaSPAdes (Nurk *et al.*, 2017), which is recommended when assembling metagenomics data sets. The obtained scaffolds from this assembly were used in the following analysis.

Contigs were taxonomically classified with Kraken2 (version 2.0.7 beta) (Wood and Salzberg, 2014).

The presence of ARGs in the viromes was determined by the specific software ResFinder (version 4.1) (Zankari *et al.*, 2012). Since this software is very restrictive, ARGs search was completed with CARD database (McArthur *et al.*, 2013) and Prokka (version 1.14.5) (Seemann, 2014) with the terms 'resist', 'beta-lactam', 'penicillin' which includes antibiotic as well as other resistances.

Comparison of sequences between the chicken liver and faecal viromes was also done by BLAST+ (version 2.10.1). For this, two Blastn queries (PL vs. HP1 and PL vs. HP2) were performed. The PL sequences were inputted as a query, and the HP1 and HP2 files were the database where the query was searched in each comparison. It was determined that the output matches must have an E-value $< 1^{-10}$, which indicated an almost identical match.

Data availability

The metagenomic data set generated was deposited in BioProject (PRJNA782068).

Statistics

Statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science Software (SPSS). A paired Student's-*t* test ($P < 0.05$) was used to evaluate the differences between ARGs in sterile and non-sterile liver samples.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2016-75536-P and PID2020-113355GB-I00), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European regional fund (ERF). The study was partially supported by the Union Iberoamericana de Universidades (UIU-OHOW) and the Generalitat de Catalunya (2017SGR170). CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya is also acknowledged. P. B-P has a grant from the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2017-081296). L. R.-R is a lecturer of the Serra-Hünter program, Generalitat de Catalunya.

Conflict of interest

None declared.

References

- Abdelhamid, M.K., Quijada, N.M., Dzieciol, M., Hatfaludi, T., Bilic, I., Selberherr, E., *et al.* (2020) Co-infection of chicken layers with *Histomonas meleagridis* and avian pathogenic *Escherichia coli* is associated with dysbiosis, cecal colonization and translocation of the bacteria from the gut lumen. *Front Microbiol* **11**: 586437.
- Anonymous. (2000) ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 2: enumeration of somatic coliphages.
- Antimicrobial Resistance in the Environment Summary Report of an FAO Meeting of Experts FAO Antimicrobial Resistance Working Group (2018).
- Awad, W.A., Dublec, F., Hess, C., Dublec, K., Khayal, B., Aschenbach, J.R., and Hess, M. (2016) *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. *Poult Sci* **95**: 2259–2265.
- Blanco-Picazo, P., Fernández-Orth, D., Brown-Jaque, M., Miró, E., Espinal, P., Rodríguez-Rubio, L., *et al.* (2020) Unravelling the consequences of the bacteriophages in human samples. *Sci Rep* **10**: 6737.

- Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., *et al.* (2020) Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean seawater ecosystems. *Microorganisms* **8**: 1293.
- Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., and Rohwer, F. (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* **185**: 6220–6223.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., and Muniesa, M. (2015) Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid* **79**: 1–7.
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., and Navarro, F. (2016) Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Sci Rep* **6**: 33000.
- Capparelli, R., Ventimiglia, I., Roperto, S., Fenizia, D., and Iannelli, D. (2006) Selection of an Escherichia coli O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infect* **12**: 248–253.
- Chen, M., An, X., Liao, H., Yang, K., Su, J., and Zhu, Y. (2021) Viral community and virus-associated antibiotic resistance genes in soils amended with organic fertilizers. *Environ Sci Technol* **55**: 13881–13890.
- Chen, Y., Guo, J., Shi, D., Fang, D., Chen, C., and Li, L. (2018) Ascitic bacterial composition is associated with clinical outcomes in cirrhotic patients with culture-negative and non-neutrocytic ascites. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 420.
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., and Mora, D. (2016) Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: fiw003.
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., and Jofre, J. (2014) Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ Int* **73**: 167–175.
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011a) Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4908–4911.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., and Muniesa, M. (2011b) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**: e17549.
- D'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles disenterique. *Comptes Rendus L'Academie Sci Paris* **165**: 373–375.
- Dąbrowska, K. (2019) Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med Res Rev* **39**: 2000.
- European Commission. 2020. *EU agricultural outlook 2020-30: sustainability objectives to impact meat and dairy along the supply chain*. https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/agricultural-outlook-2020-report_en.pdf.
- Fernández-Orth, D., Miró, E., Brown-Jaque, M., Rodríguez-Rubio, L., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., *et al.* (2019) Faecal phageome of healthy individuals: presence of antibiotic resistance genes and variations caused by ciprofloxacin treatment. *J Antimicrob Chemother* **74**: 854–864.
- Fillol-Salom, A., Bacigalupe, R., Humphrey, S., Chiang, Y.N., Chen, J., and Penadés, J.R. (2021) Lateral transduction is inherent to the life cycle of the archetypical Salmonella phage P22. *Nat Commun* **12**: 6510.
- Firleyanti, A.S., Connerton, P.L., and Connerton, I.F. (2016) Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: the prospect for phage biocontrol. *Int J Food Microbiol* **237**: 121–127.
- Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541–548.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2005) Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2949–2953.
- Gómez-Gómez, C., Blanco-Picazo, P., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Rodríguez-Rubio, L., Cerdà-Cuellar, M., and Muniesa, M. (2019) Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Sci Rep* **9**: 13281.
- Górski, A., Wazna, E., Dąbrowska, B.-W., Dąbrowska, K., Swiata-Jeleń, K., and Miedzybrodzki, R. (2006) Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**: 313–319.
- Hatfull, G.F. (2008) Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol* **11**: 447–453.
- Humphrey, S., Fillol-Salom, A., Quiles-Puchalt, N., Ibarra-Chávez, R., Haag, A.F., Chen, J., and Penadés, J.R. (2021) Bacterial chromosomal mobility via lateral transduction exceeds that of classical mobile genetic elements. *Nat Commun* **12**: 6509.
- Inchley, C.J. (1969) The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clin Exp Immunol* **5**: 173.
- Jofre, J. (2007) Indicators of waterborne enteric viruses. In *Human Viruses in Water. Perspectives in Medical Virology*. Bosch, A. (ed). Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, pp. 227–249.
- Kadlec, K., and Schwarz, S. (2009) Novel ABC transporter gene, vga(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 strain. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 3589–3591.
- Kawato, Y., and Nakai, T. (2012) Infiltration of bacteriophages from intestinal tract to circulatory system in goldfish. *Fish Pathol* **47**: 1–6.
- Kaźmierczak, Z., Majewska, J., Milczarek, M., Owczarek, B., and Dąbrowska, K. (2021) Circulation of fluorescently labelled phage in a murine model. *Viruses* **13**: 297.
- Keller, R., and Traub, N. (1974) The characterization of *Bacteroides fragilis* bacteriophage recovered from animal sera: observations on the nature of bacteroides phage carrier cultures. *J Gen Virol* **24**: 179–189.
- Laconi, A., Drigo, I., Palmieri, N., Carraro, L., Tonon, E., Franch, R., *et al.* (2021) Genomic analysis of extra-intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from commercial chickens. *Vet Microbiol* **259**: 109161.
- Lanier, W.A., Hale, K.R., Geissler, A.L., and Dewey-Mattia, D. (2018) Chicken liver-associated outbreaks of campylobacteriosis and salmonellosis, United States, 2000–2016:

- Identifying opportunities for prevention. *Foodborne Pathog Dis* **15**: 726–733.
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., and Balcázar, J.L. (2017) Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ Pollut* **220**: 981–984.
- McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., *et al.* (2013) The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3348–3357.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., *et al.* (2018) Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. *Anim Nutr* **4**: 170–178.
- Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., and Adhya, S. (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3188–3192.
- Minot, S., Sinha, R., Chen, J., Li, H., Keilbaugh, S.A., Wu, G.D., *et al.* (2011) The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res* **21**: 1616–1625.
- Nhung, N.T., Chansiripornchai, N., and Carrique-Mas, J.J. (2017) Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Front Vet Sci* **4**: 126.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., and Pevzner, P.A. (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* **27**: 824–834.
- OECD/FAO. (2018) *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018–2027*. Rome, Italy: OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H.H., and Segre, J.A. (2014) Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* **514**: 59–64.
- Podlacha, M., Grabowski, Ł., Kosznik-Kawśnicka, K., Zdrojewski, K., Stasiójć, M., Węgrzyn, G., and Węgrzyn, A. (2021) Interactions of bacteriophages with animal and human organisms—safety issues in the light of phage therapy. *Int J Mol Sci* **22**: 8937.
- Poultry | European Commission. Information on an overview of EU poultry, market measures and standards, trade measures, market monitoring, legal bases and committees. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/animals-and-animal-products/animal-products/poultry_en
- Programa REDUCE Pollos Broiler | PRAN. https://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/content_images/2020.07.22_acuerdo_base_broiler_entidades.pdf
- Pruden, A., Arabi, M., and Storteboom, H.N. (2012) Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ Sci Technol* **46**: 11541–11549.
- Ross, J., and Topp, E. (2015) Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Appl Environ Microbiol* **81**: 7905–7913.
- Rusckowski, M., Gupta, S., Liu, G., Dou, S., and Hnatowich, D.J. (2008) Investigation of four 99mTc-labeled bacteriophages for infection specific imaging. *Nucl Med Biol* **35**: 433.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Long Island, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 999.
- Seemann, T. (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**: 2068–2069.
- Srivastava, A.S., Chauhan, D.P., and Carrier, E. (2004) In utero detection of T7 phage after systemic administration to pregnant mice. *Biotechniques* **37**: 81–83.
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., and Simonet, P. (2016) Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents* **48**: 163–167.
- Van Bellegghem, J.D., Dąbrowska, K., Vanechoutte, M., Barr, J.J., and Bollyky, P.L. (2019) Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses* **11**: 10.
- Virgin, H.W. (2014) The virome in mammalian physiology and disease. *Cell* **157**: 142–150.
- Wang, M., Sun, Y., Zeng, Z., and Wang, Z. (2021) Metagenomics of wastewater phageome identifies an extensively cored antibiotic resistome in a swine feedlot water treatment environment. *Ecotoxicol Environ Saf* **222**: 112552.
- Wood, D.E., and Salzberg, S.L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol* **15**: 46.
- World Health Organization. (2018) *Antibiotic Resistance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., *et al.* (2018) Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* **6**: 34.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., *et al.* (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **67**: 2640–2644.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. Oligonucleotides used in this study.

Table S2. Percentages of viral species in fecal viromes.

Table S3. Common species detected in the two viromes compared (PL vs HP1 or PL vs HP2).

4.4. Capítulo 4:

Resistencia a antibióticos en la fracción vírica de productos lácteos y de una bebida vegetal

Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a plant-based milk

Pedro Blanco-Picazo, Clara Gómez-Gómez, Sara Morales-Cortes, Maite Muniesa y Lorena Rodríguez-Rubio

International Journal of Food Microbiology (2022); 367, 1-8, 109590.

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590

Introducción

El uso de antibióticos en ganadería está ampliamente extendido tanto para la prevención como para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Cabello, 2006; Kemper, 2008) y un uso intensivo de los mismos puede contribuir al desarrollo de resistencias. Las bacterias comensales del ganado pueden convertirse en reservorios de GRAs ante la elevada presión selectiva a la que están sometidas, pudiendo transferir estos GRAs a bacterias patógenas. Además, las bacterias resistentes pueden difundirse a través del consumo de alimentos (carne, leche, huevos, etc.) y finalmente llegar a diseminarse al ambiente a través de los restos fecales de animales (Gomes & Henriques, 2016; Manyi-Loh et al., 2018).

En estudios previos se demostró la presencia de partículas fágicas que contenían GRAs en ambientes con contaminación fecal como suelos, aguas residuales y lodos (Balcázar, 2014; Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2014b; Colomer-Lluch et al., 2011a; Lekunberri et al., 2017b; Ross & Topp, 2015), en aguas de mar (Calero-Cáceres & Balcázar, 2019), incluidos ambientes marinos con bajo impacto antropogénico (Blanco-Picazo et al., 2020), así como en humanos y animales (Brown-Jaque et al., 2018a; Colomer-Lluch et al., 2011b). Además, estudios recientes han demostrado que las partículas fágicas con GRAs pueden llegar a los alimentos aptos para el consumo humano (vegetales, carne y pescados), indicando que la presencia de fagos en las heces puede ser resultado de su movilización mediante una ruta circular oral-fecal-ambiente-oral (Blanco-Picazo et al., 2020; Gómez-Gómez et al., 2019; Larrañaga et al., 2018).

Objetivos

El objetivo de este estudio es confirmar la presencia de partículas fágicas infecciosas con GRAs en productos lácteos y una bebida vegetal aptos para su consumo, las cuales, tras ser ingeridas, podrían tener un papel importante en la transducción de GRAs, contribuyendo a la evolución y desarrollo de nuevas resistencias.

Resultados y discusión

Se analizaron 50 muestras, 10 de cada una de las siguientes matrices: leche pasteurizada, queso fresco, kéfir, yogurt y horchata. En el análisis microbiológico se detectaron bacterias aerobias resistentes a ampicilina en todas las matrices excepto en el yogur (Tabla 2), posiblemente debido a su proceso de fabricación (Aryana & Olson, 2017), dando valores especialmente elevados en queso fresco y horchata (cerca de 10^9 UFC/25 gramos o UFC/100 ml, respectivamente). Se detectó *E. coli* (indicador de contaminación fecal) en kéfir, queso fresco y horchata, y en una muestra de queso fresco se obtuvieron valores superiores a los establecidos para su consumo, detectando en esta misma muestra *E. coli* resistentes a ampicilina (Tabla 2). También se encontraron colifagos somáticos (utilizado como indicador fecal vírico) en todas las matrices analizadas a excepción de la leche, donde el proceso de pasteurización ha podido llegar a inactivar los fagos infecciosos presentes en la muestra. Hay que destacar que, aunque la detección de fagos está comenzando a incluirse en las normativas de agua de bebida (WHO, 2017b) hasta la fecha todavía no están incluidos en las normativas de seguridad alimentaria.

El análisis de GRAs en la fracción fágica mediante qPCR se realizó en las muestras directas y tras un paso de enriquecimiento sobre la cepa de *E. coli* WG5, cepa que, además de ser utilizada en los protocolos de enumeración de colifagos somáticos y ser susceptible a la infección fágica (Larrañaga et al., 2018), no contiene en su genoma ningún profago ni ninguno de los GRAs analizados en este estudio. Los resultados revelaron la presencia de GRAs en todos los grupos de muestras (10-100% de las muestras), tanto en el análisis directo como tras la propagación, siendo el kéfir la única matriz en la que se detectaron todos los GRAs, algunos de ellos sólo tras el paso de enriquecimiento (Fig. 1). De todos los genes analizados, los que presentaron un mayor porcentaje de positivos fueron los que proporcionan resistencia a β -lactámicos, destacando entre ellos al gen *bla*_{TEM}, localizado en un 90-100% de las muestras (Fig. 1). El estudio de propagación reveló la presencia de algunos GRAs en fagos que no se detectaron en el análisis directo de las muestras. Además, se observó un incremento de positivos para GRAs en algunos genes, especialmente en el gen *bla*_{VIM} (presente en todas las matrices excepto en yogur) y *bla*_{OXA-48} (leche, queso fresco y horchata) (Fig. 1), indicando que parte de las partículas fágicas portadoras de GRAs eran infecciosas.

En la comparativa entre el número de copias genómicas de los GRAs detectadas entre el análisis directo y tras el paso de propagación (Fig. 2), se observa un incremento de copias genómicas en prácticamente todos los GRAs (Fig. 2, columnas verdes), indicando que una fracción de las partículas fágicas son capaces de infectar a la cepa de *E. coli* y propagar. Los genes *bla*_{VIM} y *bla*_{OXA-48} fueron los que mayor incremento de CG presentaron, superior a 5 log₁₀ CG (Fig. 2). Además de ser el GRA más prevalente en la fracción fágica, el gen *bla*_{TEM} también presentó un incremento cercano a 2 log₁₀ CG tras la propagación en todas las muestras, excepto en una de yogur. Por otra parte, cuando no se detectaron GRAs o el número de copias genómicas disminuyó tras la propagación (Fig. 2, columnas rojas) se consideró que las partículas fágicas no eran capaces de propagar, observándose la mayor reducción en el número de copias genómicas en el yogur (1.3-5.7 log₁₀) (Fig. 2).

Aunque la razón de los diferentes incrementos detectados no está clara, podría atribuirse a que algunos GRAs son más proclives a ser empaquetados mediante mecanismos de transducción especializada por su ubicación en el genoma de la cepa huésped original, generando fagos funcionales capaces de infectar (Schneider, 2017), causando un incremento de GRAs. No obstante, los GRAs localizados en regiones aguas abajo del lugar de inserción de los diferentes profagos también pueden ser movilizados mediante la transducción lateral (Chen et al., 2018) generando partículas fágicas transductantes que sólo contienen ADN bacteriano, siendo entonces incapaces de propagar. Hay que considerar que las propagaciones se realizaron sobre la cepa *E. coli* WG5, que podría no ser la mejor cepa huésped para fagos presentes en productos lácteos y horchata.

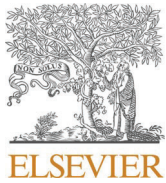
La visualización por microscopía electrónica confirmó la presencia de las partículas fágicas en queso fresco, kéfir y horchata, observándose fagos de morfología tipo *Myoviridae* en queso fresco (Fig. 3A) y fagos de morfología tipo *Siphoviridae* en horchata (Fig. 3B) y kéfir (Fig. 3C y 3D).

Debido a la ubicuidad de los bacteriófagos, su presencia en productos lácteos no es inesperada. En lácteos, el origen de las partículas fágicas podría atribuirse a la leche cruda (o a la chufa en el caso de la horchata) (Madera et al., 2004), a las cepas utilizadas como cultivos iniciadores en algunos productos (Chopin et al., 2001) o a una contaminación durante el proceso de producción (Marcin, 2020). Independientemente de su origen, los fagos permanecen en la leche incluso después del tratamiento de pasteurización (Atamer et al., 2013). Inicialmente la ingestión de bacteriófagos presentes en productos lácteos no debería ser perjudicial, considerando que se encuentran en nuestra propia microbiota intestinal (Fernández-Orth et al., 2019; Reyes et al., 2010), así como en otros biomas humanos y animales (Letarov & Kulikov, 2009; Navarro & Muniesa, 2017; Nguyen et al., 2017).

A pesar de los potenciales beneficios que puede generar el uso de fagos en alimentos (alternativa a químicos y antibióticos, eliminación de patógenos, tratamiento de superficies, etc.) (Campbell, 2003; O'Sullivan et al., 2019; Schmelcher & Loessner, 2014), su papel como vehículos en la transferencia horizontal de genes (especialmente GRAs) (Koutsoumanis et al., 2021; Lood et al., 2017) está siendo subestimado, y pueden llegar a tener importantes repercusiones al actuar como un reservorio de genes, asociados en algunos casos con factores de virulencia.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de partículas fágicas con GRAs en productos lácteos y en horchata considerados aptos para su consumo según los parámetros microbiológicos recogidos en las normativas alimentarias. Además, los experimentos de propagación revelaron que parte de estas partículas fágicas son infecciosas y capaces de propagar en la cepa huésped utilizada. Este estudio sugiere que las partículas fágicas presentes en productos lácteos pueden llegar a constituir un reservorio de GRAs que podrían ser transducidos (mediante diversos mecanismos de transducción) a nuestra propia microbiota tras su ingestión, incentivando el surgimiento de nuevas bacterias resistentes, así como de nuevas resistencias.



Antibiotic resistance in the viral fraction of dairy products and a nut-based milk

Pedro Blanco-Picazo, Clara Gómez-Gómez, Sara Morales-Cortes, Maite Muniesa, Lorena Rodríguez-Rubio*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacteriophage
Transduction
ARG
Horchata

ABSTRACT

Phages, the most abundant biological entities in the biosphere, can carry different bacterial genes, including those conferring antibiotic resistance. In this study, dairy products were analyzed by qPCR for the presence of phages and phage particles containing antibiotic resistance genes (ARGs). Eleven ARGs were identified in 50 samples of kefir, yogurt, milk, fresh cheese and nut-based milk (horchata), purchased from local retailers in Barcelona. Propagation experiments showed that at least some of the phages isolated from these samples infected *Escherichia coli* WG5, which was selected as the host strain because it does not contain prophages or ARGs in its genome. Electron microscopy revealed that the phage particles showed morphologies compatible with the *Myoviridae* and *Siphoviridae* families. Our results show that dairy products contain ARGs within infectious phage particles and may therefore serve as a reservoir of ARGs that can be mobilized to susceptible hosts, both in the food matrix and in the intestinal tract after ingestion.

1. Introduction

Antibiotic resistance is recognized as a worldwide threat to human health. The overuse of antibiotics in human and veterinary medicine has led to the emergence of antibiotic resistances and epidemiological studies verify that antibiotic consumption is directly connected with this emergence and the dissemination of resistances (More, 2020; Ventola, 2019).

In livestock, although their application as growth supplements has been banned in Europe since 2006 (The European Parliament and the Council of the European Union, 2003), antibiotics are still widely used for prophylaxis and/or treatment of infectious diseases (Cabello, 2006; Kemper, 2008). The continuous exposure of animals to antibiotics promotes the development of antimicrobial resistance. Under persistent selective pressure, commensal bacteria in livestock become reservoirs of antibiotic resistance genes (ARGs), which can be transferred to pathogenic bacteria. Resistant bacteria can be transmitted through the consumption of meat and other livestock products (e.g., milk and eggs) and be disseminated in the environment via animal wastes (Gomes and Henriques, 2016; Manyi-Loh et al., 2018). Additionally, antibiotic residues have been detected in animal tissues and milk (Landers et al., 2012; Sachi et al., 2019).

Agents of antimicrobial resistance, including ARGs, have been reported in different genera of lactic acid bacteria (LAB) isolated from dairy products, where they are the most abundant microorganisms (Erginkaya et al., 2018; Wang et al., 2019). Although most LAB strains are not pathogenic, the ARGs they harbor may be disseminated to other microorganisms. In addition, antibiotic resistance has been detected in viromes isolated from the air environment of dairy processing plants as well as in agricultural slurry (Colombo et al., 2018; Cook et al., 2021), which therefore represent additional reservoirs of antimicrobial resistance.

Antibiotics are naturally produced by microorganisms as a protective mechanism against competitors (Checcucci et al., 2020). While resistance to antibiotics is intrinsic to bacteria, it may also be acquired by mutation or horizontal gene transfer (Von Wintersdorff et al., 2016). The most studied mechanisms of DNA mobilization are conjugation and transformation, but transduction events or gene transfer mediated by phages have been recently revealed as another important route (Balcázar, 2020; Lekunberri et al., 2017).

Bacteriophages are the most abundant and ubiquitous biological entities in the world, outnumbering bacteria by an estimated ten-fold (Suttle, 2007). They are present in every ecosystem where bacteria exist (Pujato et al., 2019) and have a long persistence in the

* Corresponding author.

E-mail address: lorenarodriguez@ub.edu (L. Rodríguez-Rubio).

environment. Phage resilience facilitates the diffusion of ARGs located in phage particles, increasing the potential for ARGs transduction (Calero-Cáceres and Muniesa, 2016), which can be generalized, specialized or lateral (Chen et al., 2018; Penades et al., 2015; Thierauf et al., 2009). Phage particles carrying ARGs have been reported in sludge, soil, wastewater (Balcázar, 2014; Calero-Cáceres et al., 2014; Colomer-Lluch et al., 2014a, 2011b; Lekunberri et al., 2017; Ross and Topp, 2015), seawater (Calero-Cáceres and Balcázar, 2019), including marine ecosystems with a low anthropogenic impact (Blanco-Picazo et al., 2020), and in human and animal organisms (Brown-Jaque et al., 2018a, 2018b; Colomer-Lluch et al., 2011a). Recent studies have also confirmed that ARGs-carrying phage particles can end up in food products (vegetables, meat, and fish) apt for consumption, indicating that their presence in feces could be the result of phage mobilization by a circular oral-fecal-environmental-oral route (Blanco-Picazo et al., 2020; Gómez-Gómez et al., 2019; Larrañaga et al., 2018).

In this study, pasteurized milk and different pasteurized dairy products were analyzed for the presence of ARGs-carrying phages. This food group was selected as suitable for studying how antimicrobial resistance can be disseminated through closely linked routes involving animals, humans, and the environment, as outlined in the One-Health initiative (Hernando-Amado et al., 2019). Additionally, due to growing consumer demand for non-dairy plant milks, fresh horchata, a traditional Spanish beverage made from tiger nuts, was included in the study.

2. Material and methods

2.1. Samples

Samples of pasteurized milk (treated at 63 °C for 30 min), fermented lactic products (artisanal yogurt and kefir), fresh cheese prepared with pasteurized milk, and fresh, unpasteurized horchata, a nut-based milk, were analyzed. Ten samples of each were purchased from local retailers in the Barcelona area during 2020–2021. All samples were kept at 4 °C until analysis, which was performed within 24 h of purchase.

Twenty grams or milliliters of each sample were homogenized/mixed for 2 min in 60 ml of phage buffer (22 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, and 0.1 mM CaCl₂) using the Stomacher homogenizer (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany). Stomacher bags with filters (Afora, Barcelona, Spain) were used to improve the separation of solid waste from the liquid fraction containing the microorganisms.

2.2. Bacterial and viral indicators

Serial decimal dilutions of the homogenates were used to evaluate in duplicate total aerobic microorganisms resistant to ampicillin, *E. coli* and ampicillin-resistant *E. coli*. Total aerobic bacteria were determined on Tryptone Soy Agar (Condalab, Madrid, Spain) with ampicillin (100 µg/ml) at 37 °C for 18 h. *E. coli* was determined on Chromocult® Coliform Agar (Merck, Darmstadt, Germany) without or with the addition of ampicillin (100 µg/ml) and incubated at 44 °C for 18 h. Suspected *E. coli* blue colonies obtained on Chromocult® Coliform Agar were confirmed with the Indole test and growth in McConkey Agar (BD, USA).

Somatic coliphages were determined in the samples for their role as fecal viral indicators (Jofre, 2007). Ten milliliters of the homogenates were centrifuged for 15 min at 4000 ×g, and the supernatant was filtered through 0.22 µm low protein binding polyethersulfone membranes (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA). The filtrates were analyzed in duplicate for the presence of somatic coliphages according to the ISO standard method (Anonymous, 2000), which uses *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) as the bacterial host. Bacteriophage determination was performed by the double agar layer method and incubation at 37 °C for 18 h (Anonymous, 2000).

2.3. Purification of phage particles

As described in previous studies (Blanco-Picazo et al., 2020; Gómez-Gómez et al., 2019), the homogenate centrifuged at 4000 ×g and filtered through 0.22 µm polyethersulfone membranes was then treated with chloroform (1:10) (v/v) to remove the possible presence of vesicles containing DNA. Samples were vortexed for 5 min and centrifuged at 16,000 ×g for 5 min. The aqueous phase was separated and treated with DNase I (100 units/ml; Sigma-Aldrich, Spain) at 37 °C for 1 h to eliminate any free DNA present in the samples outside the phage particles. DNase was inactivated by heating for 5 min at 75 °C. After this step, aliquots were taken and used as controls in qPCR to rule out the presence of non-encapsidated DNA.

2.4. Phage DNA extraction

The phage suspensions were then processed to extract the DNA within the phage particles. Following treatment with proteinase K (20 mg/ml) in 250 µl of proteinase K buffer and incubation for 1 h at 55 °C (Sambrook and Russel, 2001), the encapsidated DNA was extracted by phenol-chloroform (1:1) (v/v) and chloroform treatment. DNA was precipitated using 100% ethanol and 3 M sodium acetate and resuspended in 50 µl of ultrapure water. DNA was quantified using a Qubit® Fluorometer (Life Technologies, CA, US).

2.5. Amplification of ARGs in DNA from phage particles

Quantitative real-time PCR (qPCR) using TaqMan hydrolysis probes was performed with a StepOne Real Time PCR System in a 20 µl reaction mixture with the TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 9 µl of the sample DNA or standards with known DNA concentration. The results were analyzed with the Applied Biosystems StepOne™ Instrument program. Eleven diverse ARGs with clinical relevance were evaluated: five genes that confer resistance to β-lactam antibiotics (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1} group, *bla*_{CTX-M-9} group, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{VIM}); two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*); a gene conferring resistance to methicillin (*mecA*), commonly found in *Staphylococcus* (Colomer-Lluch et al., 2011b); *armA*, which encodes aminoglycoside resistance and is widely distributed in *Enterobacteriaceae* (Galimand et al., 2005); and *sul1* and *tetW*, which confer resistance to sulfonamides and tetracycline, respectively, have wide application in the livestock industry and are frequently found in environmental bacterial populations (Cheng et al., 2013; Pruden et al., 2012).

For quantification, serial dilutions of a known concentration of gBlocks™ Gene Fragments (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) for each ARG were used to generate the standard curves in each qPCR assay. All samples were run in triplicate (including the standards and negative controls). The number of gene copies (GC) was defined as the mean of the triplicate data obtained. To evaluate ARG abundance, the GC were calculated with the standard curves using the last valid cycle threshold for each ARG assay (Table 1), when the standard curve was consistent in the diverse replicates. The standards were also used as positive controls.

To ensure that only ARGs from the phage particles were detected, several controls were performed as previously described (Gómez-Gómez et al., 2019). Briefly, after filtration and treatment with chloroform and DNase and before proteinase K digestion for desencapsidation, an aliquot of each sample was tested to confirm the absence of each ARG and the bacterial *16S rRNA* by qPCR amplification. *16S rRNA* was amplified using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) (Table 1). Only samples negative for the respective ARGs and *16S rRNA* were considered free of non-encapsidated DNA and included in the analysis.

Table 1
Oligonucleotides used in this study

Target gene	Oligonucleotide	Sequence	Amplimer (bp)	LOQ (GC/μl)	Reference
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTAATTCTCAGAATGACTTGGT	85	35.2	(Lachmayr et al., 2009)
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTTCATG			
	TaqMan TEM	6FAM-CCAGTACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ			
<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	37	(Colomer-Lluch et al., 2011b)
	LP	ACATCGCGACGGCTTCT			
	TaqMan CTX-M-1	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ			
<i>bla</i> _{CTX-M-9} group	UP	ACCAATGATATTCGCGGTGAT	85	35.4	(Colomer-Lluch et al., 2011a)
	LP	CTGCGTTCGTGTGGGGT			
	TaqMan CTX-M-9	6FAM - TCGTGGCCGCTG-MGBNFQ			
<i>bla</i> _{OXA-48}	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	32.4	(Brown-Jaque et al., 2018a)
	LP	TGGTTCGCCCGTTTAAGATT			
	TaqMan OXA-48	6FAM-CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ			
<i>bla</i> _{VIM}	UP	AATGGTCTCATTGTCCGTGATG	61	33.9	(Larrañaga et al., 2018)
	LP	TCCGACCCACGCTGTA			
	TaqMan VIM	6FAM-TGATGAGTTGCTTTTATTGATTG-MGBNFQ			
<i>sul1</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	34.8	(Calero-Cáceres et al., 2014)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT			
	TaqMan sul1	6FAM-CGAGCCTTGCAGCGG-MGBNFQ			
<i>mecA</i>	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTGTAA	92	33.8	(Volkman et al., 2004)
	LP	TGGTCTTTCGATTCTCGGA			
	TaqMan mecA	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTCCACA-MGBNFQ			
<i>qnrA</i>	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	31.1	(Colomer-Lluch et al., 2014b)
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG			
	TaqMan qnrA	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ			
<i>qnrS</i>	UP	CGACGTGCTAACTTGCCTGA	118	34.6	(Colomer-Lluch et al., 2014b)
	LP	GGCATTGTTGAAACTTGA			
	TaqMan qnrS	6FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ			
<i>armA</i>	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAATGACTT	94	33.4	(Quirós et al., 2014)
	LP	GATTGAAGCCACAACCAAAATCT			
	TaqMan armA	6FAM-TCAAACATGCTCATCTATT-MGBNFQ			
<i>tetW</i>	UP	GACGGACACCATGTTTTTGA	62	34.8	(Blanco-Picazo et al., 2020)
	LP	AGGAAGTGACTGCCGCTTGA			
	TaqMan tetW	6FAM-AGCGTGGGATTACCA-MGBNFQ			
16S rRNA	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	236		(Weisburg et al., 1991)
	518R	ATTACCGGGCTGCTGG			

2.6. Propagation cultures

The ability of phage particles in the samples to infect a host strain and propagate was evaluated. The strain *E. coli* WG5, also used to enumerate somatic coliphages, was selected because of its susceptibility to phage infection (Larrañaga et al., 2018), and because its genome does not contain any of the ARGs targeted in this study or any prophage (Imamovic et al., 2018).

Propagation cultures were prepared with 1 ml of the phage suspension (obtained after filtration, chloroform and DNase treatment) and 1 ml of *E. coli* WG5 in the exponential phase (OD₆₀₀ 0.3) in 8 ml of Luria-Bertani broth (LB) and then incubated overnight at 37 °C with shaking. After incubation, the phages were purified by filtration through 0.22 μm low protein binding polyethersulfone membranes and treated with chloroform and DNase as indicated above.

The infectivity of the phage particles carrying ARGs was evaluated by comparing the abundance of ARGs by qPCR before (direct quantification from the sample) and after phage propagation in the enrichment cultures. If the ARGs copy numbers in phage particles increased after propagation, it was considered that the phage particles were able to infect and propagate on the host strain. Otherwise, if ARGs levels decreased, the particles were considered incapable of propagating.

2.7. Transmission electron microscopy

The presence of phage particles in the supernatant of enrichment cultures after the propagation step was verified by observation with a transmission electron microscope (TEM). Phages were purified as described above from 2 ml of the supernatant and 100× concentrated using protein concentrators (100-kDa Amicon Ultra centrifugal filter units; Millipore, Bedford, MA) with gentle centrifugation at 6000 ×g for the time necessary to reduce the volume to 20 μl. Seven μl of the

concentrated phage suspension was dropped onto copper grids with carbon-coated Formvar films and negatively stained with 2% ammonium molybdate (pH 6.8) for 1.5 min. Phages were visualized using a Jeol 1010 TEM (JEOL Inc. Peabody, MA USA) operating at 80 kV.

3. Results and discussion

3.1. Microbiological parameters

Microbiological criteria are used to ensure safety in food products and as a marker of good hygiene in the manufacturing process. The levels of microbial indicators observed in the dairy samples in this study were mostly within the limits established by EU regulations for safe consumption (Commission Regulation EC No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, 2005).

Aerobic ampicillin-resistant bacteria were detected in all samples analyzed except in yogurt (Table 2), with average values especially high in fresh cheese and horchata (close to 10⁹ cfu/25 g or cfu/100 ml sample, respectively). *E. coli*, used as a bacterial indicator of process hygiene, was detected in kefir, fresh cheese and horchata (Table 2). The highest average values of *E. coli* were found in fresh cheese, with one sample deemed unfit for consumption, as it failed to meet the EU requirements for this parameter (Commission Regulation EC No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, 2005). This fresh cheese sample also contained ampicillin-resistant *E. coli*, which was targeted in the analysis as this resistance is common in the most frequently used indicator bacteria (The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019, 2021). Predictably, the highest values of ampicillin-resistant *E. coli* were obtained in fresh cheese and horchata, the abundance being similar to that of *E. coli*. No bacterial indicators were observed in yogurt samples, which is

Table 2
Bacterial (CFU/25 g) and viral (PFU/25 g) indicators in dairy products and a plant-based milk.

Microorganism		Milk ^a	Kefir	Fresh cheese	Yogurt	Horchata ^a
n		10	10	10	10	10
Total aerobic bacteria amp ^R	%	40	50	60	0	70
	Average	7.1×10^6	1.3×10^6	1.9×10^9	0	1.4×10^9
	SD	8.1×10^6	2.0×10^6	3.1×10^9	0	3.7×10^9
<i>E. coli</i>	% ^b	0	20	20	0	3.0×10^1
	Average	0	8.2×10^4	3.9×10^6	0	4.1×10^4
	SD	0	1.2×10^5	5.5×10^6	0	6.9×10^4
<i>E. coli</i> amp ^R	% ^b	0	0	10	0	0
	Average	0	0	1.7×10^3	0	0
	SD	0	0	–	0	0
Somatic coliphages	% ^b	0	10	20	10	30
	Average	0	7.5×10^1	6.5×10^3	7.5×10^0	8.0×10^2
	SD	–	–	1.9×10^3	–	8.7×10^2

^a CFU/100 ml; PFU/100 ml.

^b Percentage of positive samples.

in accordance with the pasteurization or ultrapasteurization process to which raw milk is subjected before yogurt manufacture (Aryana and Olson, 2017).

The analysis also included somatic coliphages, as they have been proposed as fecal viral indicators and their presence is indicative of fecal pollution and the potential presence of viruses of fecal origin. All product types were found to contain somatic coliphages except for milk,

where the pasteurization process may have inactivated infectious phages at least below the limit of detection of the double agar layer technique used. Somatic coliphages have recently been included in drinking water management policies and new EU directives for drinking and reused water (Council of the European Union, 2020; WHO, 2017), but to date they have not been incorporated in food safety policies. Therefore, there is no established range of somatic coliphage values that correlate with fecal pollution and suitability for consumption.

3.2. Detection of ARGs in phage DNA fraction

ARGs were detected in phage DNA in all sampled foodstuffs, either directly or after propagation in *E. coli*. Depending on the ARG and the product, 10–100% of samples tested positive, kefir being the matrix where all targeted ARGs were detected, some only after propagation (Fig. 1). Despite the heterogeneity of the results, β -lactamase genes and *sulI* were the predominant ARGs in all the samples. Among β -lactamase genes, *bla*_{TEM} was the most prevalent, found in 90–100% of samples, followed by *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9}, the latter detected in 90% of milk samples by direct analysis (Fig. 1). Propagation resulted in an increase in samples positive for *bla*_{VIM} in all products except yogurt, and *bla*_{OXA-48} in milk, fresh cheese and horchata. Regarding *sulI*, 80% of kefir, fresh cheese and horchata samples were positive by direct analysis. A high prevalence of *armA* and *tetW* was also found in all the matrices; in particular, 70% of milk samples were positive for both. After propagation, *mecA* was detected in milk, kefir and fresh cheese (Fig. 1), and *qnrA* only in one sample of kefir, which also contained *mecA* and *qnrS*.

3.3. Propagation of phage particles containing ARGs

The ARG counts in phage DNA after propagation on *E. coli* WG5 were compared with those observed by direct analysis (Fig. 2). Propagation of phage suspensions revealed ARGs in samples where the ARG copy number was below the detection limit when analyzed directly. Moreover, an increase in ARG copy numbers after the enrichment step indicated that at least some of the ARG-carrying phage particles were able to

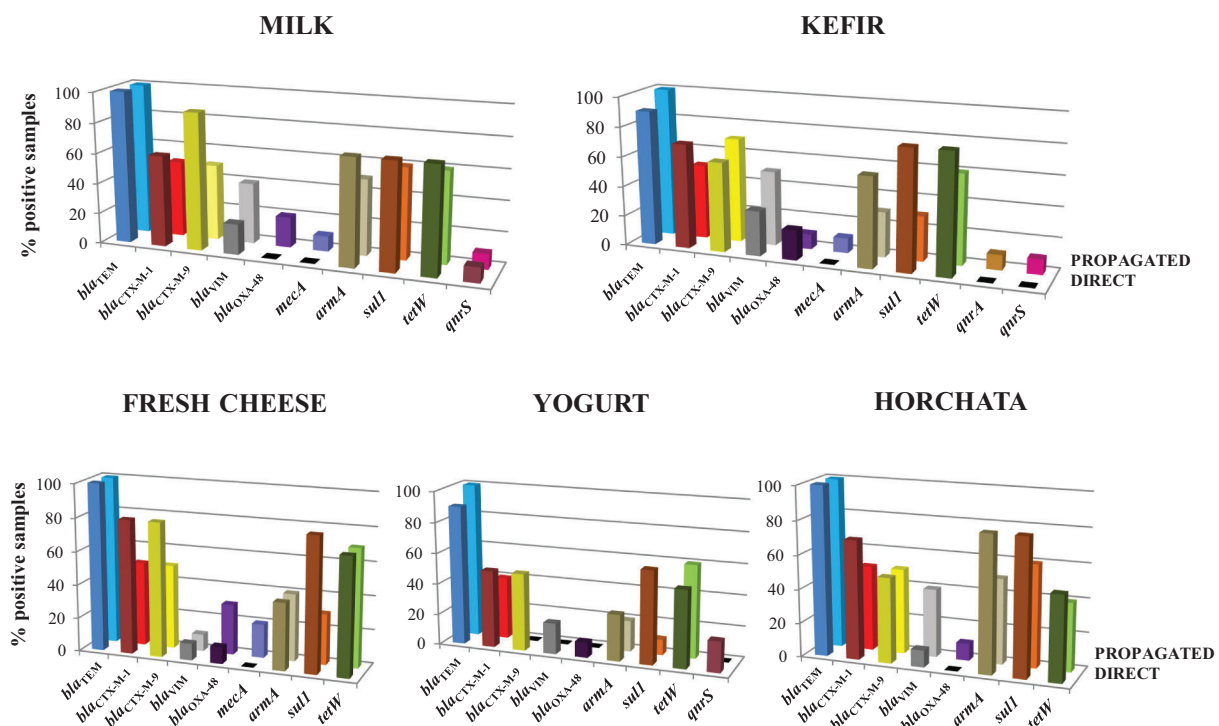


Fig. 1. Percentage of samples of each matrix (milk, fresh cheese, kefir, yogurt and horchata) where ARGs were detected in the DNA extracted from the viral fraction.

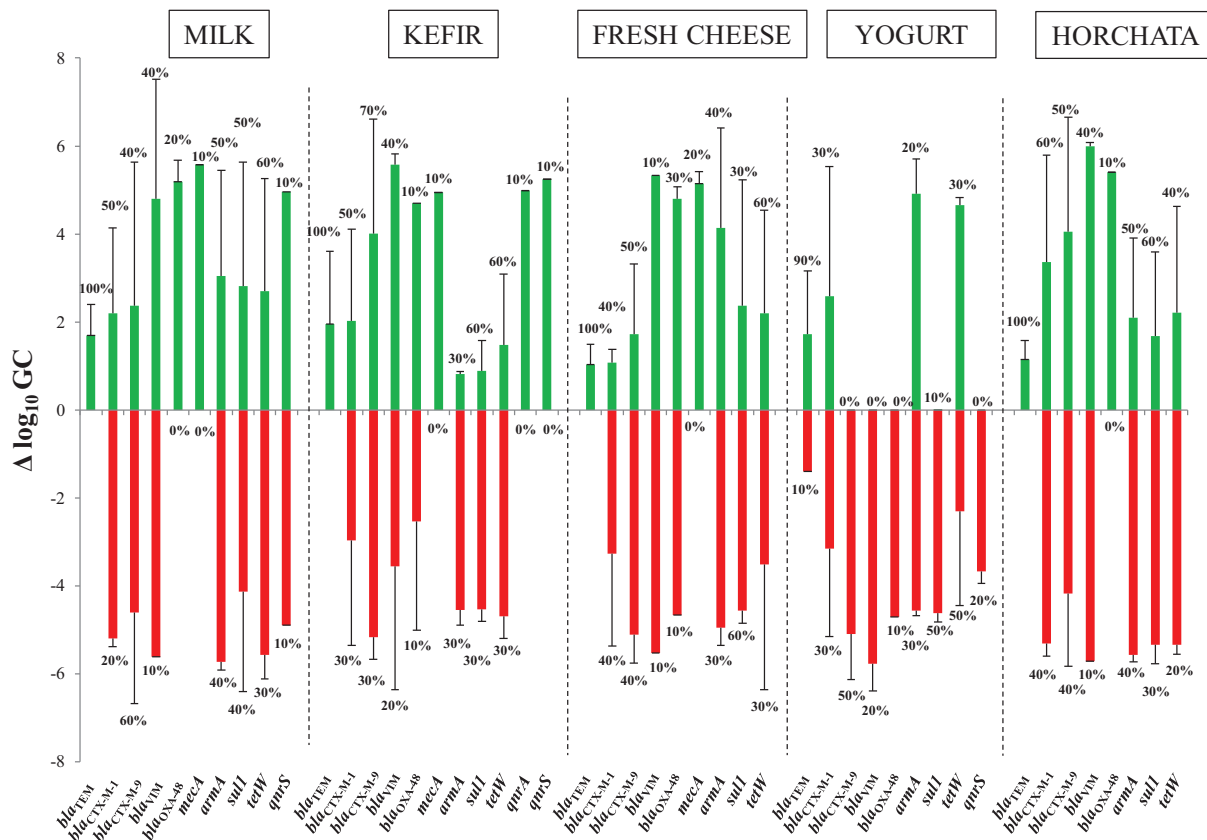


Fig. 2. Logarithmic variation in gene copy (GC) numbers of each ARG detected in the viral DNA fraction of milk, kefir, fresh cheese, yogurt and horchata samples after the propagation step. Results are grouped by the sample type. Green bars in the upper chart show the ARGs in each matrix with higher GC values after propagation. Red bars show the ARGs in each matrix with lower GC values after propagation. Bars are the average \log_{10} GC variation in the samples of each matrix and for each ARG. At the top of each bar is indicated the percentage of samples of each matrix with an increase or reduction in the \log_{10} GC values.

infect an *E. coli* strain and propagate (Fig. 2, green columns), providing information about their infectious nature. In these cases, phages containing the ARG may have incorporated the gene in the phage genome by mechanisms similar to specialized transduction (Schneider, 2017), which generates phages with a functional genome able to initiate a lytic cycle. In contrast, when ARGs were not detected or the copy numbers decreased (Fig. 2 red columns), phage particles were considered non-infectious, either because the *E. coli* WG5 strain was not a suitable host, the particles were damaged, or because the ARGs were inside transducing particles containing only bacterial DNA and consequently unable to propagate as a phage. These transducing particles are then suspected to be derived from generalized or lateral transduction events (Chen et al., 2018; Thierauf et al., 2009).

After propagation, the copy numbers of practically all targeted ARGs increased in all the matrices except yogurt, where the reductions of 1.3–5.7 \log_{10} GC (Fig. 2) were in agreement with the lower number of phages detected in the samples and in the previous experiments. It should be noted that when there is a reduction in ARG copies, the decrease of \log_{10} GC units does not correspond only to the dilution factor (which should be 1/10), and sometimes the decrease was higher. It can be due to other factors associated with the propagation of the phages and structural stability of the particles. These include particle damage, injection of nonspecific DNA, an impaired recovery from the enrichment culture due to abundant cellular debris, or values close to or above the qPCR limit of quantification, which hinders accurate quantification.

Comparing the effect of phage propagation on the different ARGs (Fig. S1), the highest increase in GC number was observed in the β -lactamase genes *bla_{VIM}* and *bla_{OXA-48}*, which on average increased by more than 5 \log_{10} GC. The most prevalent ARG, *bla_{TEM}*, increased by almost 2 \log_{10} GC after propagation in all samples, except one of yogurt,

whereas *mecA* and *qnrA* genes increased by up to 5 \log_{10} GC in all the samples where they were present (Fig. 2). One of the least prevalent ARGs, *tetW* presented the highest percentage of samples with a higher GC after propagation (30%–70% of positive samples). There is no explanation for the different propagation levels of the phage particles containing different ARGs. Some ARGs might be more prone to be packaged because of specialized transduction events due to their genomic location in the original host, hence, generating infectious phages. In contrast, other ARGs might be located downstream phages, being more frequently mobilized by lateral transduction (Chen et al., 2018) in transducing particles unable to propagate.

It should be mentioned that the propagation experiments were carried out on *E. coli* WG5 because this host strain is highly sensitive for the detection of phages of fecal origin, some of which might harbor ARGs. It was also chosen because its genome does not contain prophages or ARGs (Imamovic et al., 2018), ensuring that the phages detected after propagation originated from the sample. Although these particular traits made it a useful tool for this study, strain WG5 is not necessarily the best host for the enrichment of phages from dairy samples or horchata, and the use of dairy-associated LAB or bacteria found in plants would likely reveal the presence of other infectious ARGs-carrying phages.

3.4. Phage particle visualization after enrichment

TEM visualization of phage particles required a minimal titer (10^8 particles), which in the case of milk and yogurt (previously found to contain few or no phages) was not achieved even after successive concentration steps. In the case of fresh cheese, kefir and horchata, phage capsids were observed. Three different phage morphological types were visualized: in fresh cheese some with capsid diameters of 70 nm and

contractile tails, corresponding to the *Myoviridae* type were observed (Fig. 3A). In horchata phages with icosahedral capsid of 50 nm and non-contractile tails (Fig. 3B) and in kefir, phage particles with elongated capsids of 50 nm long and 38 nm width and non-contractile tails (Fig. 3C and D), both corresponding to the *Siphoviridae* morphological types (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011), were visualized.

3.5. Origin of the ARG-containing phage particles

The presence of phages in dairy products is not unexpected, given their ubiquity. Phage particles, and the DNA they package, can persist outside bacteria and endure for longer than the host strain (Calero-Cáceres and Muniesa, 2016). The origin of phage particles in the analyzed samples could be the raw material (raw milk or nuts in the case of horchata) (Madera et al., 2004), the starter strains (Chopin et al., 2001) used in some of the products, although phages originating from the latter should not be able to propagate in *E. coli*, or contamination during the production process (Marcin, 2020). Milk can contain bacteria from different sources (Quigley et al., 2013) and free phage virions can also reach milk due to their unique capacity to bypass anatomical and physiological barriers (Dinleyici et al., 2021; Huh et al., 2019). Phages can also be induced from milk microbiota carrying prophages (Garneau and Moineau, 2011), which sometimes interferes with fermentation processes. In any case, regardless their origin, phages can remain in milk even after pasteurization process (Atamer et al., 2013). The ingestion of phages in dairy products should be innocuous for the consumer, considering they are present in our intestinal microbiota (Fernández-Orth et al., 2019; Reyes et al., 2010) as well as in other human and animal biomes (Letarov and Kulikov, 2009; Navarro and Muniesa, 2017; Nguyen et al., 2017).

3.6. Impact on food industry

As phages can cause starter-culture failure by attacking LAB, they have been traditionally regarded as a contaminant and source of financial loss in the dairy product industry (Pujato et al., 2019). However, new beneficial applications for phages have been proposed for the enhancement of safety in food production (García et al., 2008; O'Sullivan et al., 2019). There is growing interest in phages as an ecological alternative to antibiotics and chemical products used as preservatives and surface disinfectants along the food production chain (Campbell, 2003). Certain phage cocktails are recognized as safe for biocontrol by the Food and Drug Administration (US-FDA) (Kawacka et al., 2020), and phages have been granted a qualified presumption of safety by the European Food Safety Authority (EFSA) (Kawacka et al., 2020). Thus, phages have a range of potential applications in the food industry, including pathogen elimination (Schmelcher and Loessner, 2014), removal of biofilms (Gutiérrez et al., 2016) and the treatment of surfaces and installations (O'Sullivan et al., 2019).

There is still another way that phages can impact food and the environment, which has received less attention: their role as vehicles of horizontal gene transfer, particularly in the dissemination of ARGs (Koutsoumanis et al., 2021; Lood et al., 2017). Besides certain fecal bacteria, phages are included in regulations for microorganism control in food, but only for their interference with fermentation processes, and not as a potential reservoir of genes related with virulence. The reporting of phages or phage particles containing ARGs in different food types (Blanco-Picazo et al., 2020; Gómez-Gómez et al., 2019; Jebri et al., 2021; Larrañaga et al., 2018) and related environments (Anand et al., 2016; Colombo et al., 2016; Koutsoumanis et al., 2021; Ross and Topp, 2015; Wang et al., 2018) has increased awareness that their monitoring is advisable.

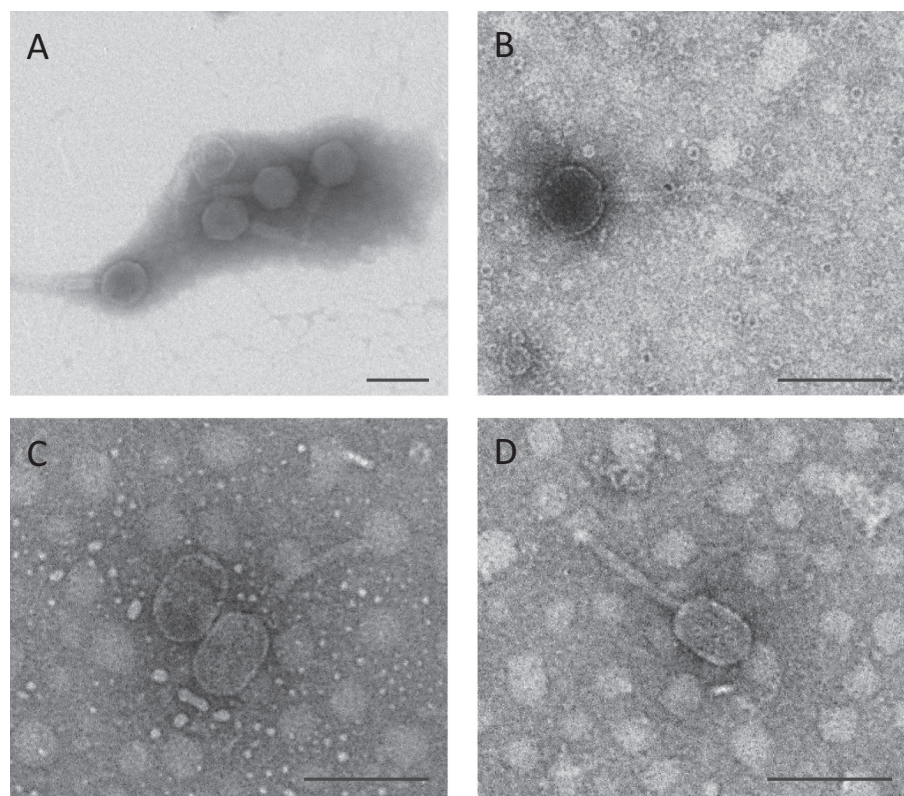


Fig. 3. Phage particle visualization by transmission electron microscopy after negatively stain with 2% ammonium molybdate. Phages were observed from fresh cheese (A), horchata (B) and kefir (C and D). Bar 100 nm.

4. Conclusion

In this study, at least a fraction of the phage population in the food samples was found to be infective which was correlated with their capacity to increase the number of ARG copies, which in turn would be released in high numbers. Moreover, both transducing particles and complete phages can transfer ARGs to suitable recipient bacteria, thereby enhancing the chances of generating new resistant strains. These events can take place in the food matrix (Colavecchio et al., 2017), during dairy food production (Picozzi et al., 2012) or even in the intestinal tract after ingestion (Colavecchio et al., 2017). In this regard, the absence of policies addressing the occurrence of ARGs-carrying phage particles in food represents a gap in the stewardship of antibiotic resistance dissemination as considered by the WHO (2018).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109590>.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2016-75536-P and PID2020-113355GB-I00), the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and the European Regional Fund (ERF). The study was partially supported by the Union Iberoamericana de Universidades (UIU-OHOW) and the Generalitat de Catalunya (2017SGR170). P. B-P has a grant from the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2017-081296). L. R.-R is a lecturer of the Serra-Hunter program, Generalitat de Catalunya.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Anand, T., Bera, B.C., Vaid, R.K., Barua, S., Riyesh, T., Virmani, N., Hussain, M., Singh, R.K., Tripathi, B.N., 2016. Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *J. Gen. Virol.* 97, 3458–3466. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000639>.
- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water Quality. Detection And Enumeration of Bacteriophages - Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages. International Standardisation Organisation, Geneva, Switzerland.
- Aryana, K.J., Olson, D.W., 2017. A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products. *J. Dairy Sci.* 100, 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12981>.
- Atamer, Z., Meike, S., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J., 2013. Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Front. Microbiol.* 4, 191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00191/BIBTEX>.
- Balcázar, J.L., 2014. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* 10, e1004219. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219>.
- Balcázar, J.L., 2020. Implications of bacteriophages on the acquisition and spread of antibiotic resistance in the environment. *Int. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00121-5>.
- Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., Muniesa, M., Rodríguez-Rubio, L., 2020. Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean seawater ecosystems. *Microorganisms* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091293>.
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J.J., Cornejo, T., Hurtado, J.C., Navarro, F., Muniesa, M., 2018a. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014>.
- Brown-Jaque, M., Oyarzun, L.R., Cornejo-Sánchez, T., Martín-Gómez, M.T., Gartner, S., de Gracia, J., Rovira, S., Alvarez, A., Jofre, J., González-López, J.J., Muniesa, M., 2018b. Detection of bacteriophage particles containing antibiotic resistance genes in the sputum of cystic fibrosis patients. *Front. Microbiol.* 9 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00856>.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>.
- Calero-Cáceres, W., Balcázar, J.L., 2019. Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats. *Sci. Total Environ.* 654, 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.166>.
- Calero-Cáceres, W., Muniesa, M., 2016. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res.* 95, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>.
- Campbell, A., 2003. The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>.
- Checucci, A., Trevisi, P., Luise, D., Modesto, M., Blasioli, S., Braschi, I., Mattarelli, P., 2020. Exploring the animal waste resistome: the spread of antimicrobial resistance genes through the use of livestock manure. *Front. Microbiol.* 11, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01416>.
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y.N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M.S.J., Fitzgerald, J.R., Penadés, J.R., 2018. Genome hypermobility by lateral transduction, 362 (Science (80-)), 207–212. <https://doi.org/10.1126/science.aat5867>.
- Cheng, W., Chen, H., Su, C., Yan, S., 2013. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China. *Environ. Int.* 61, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.023>.
- Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Chopin, M.C., 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.* 29, 644. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.3.644>.
- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., Goodridge, L.D., 2017. Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family - a review. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>.
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., Mora, D., 2016. Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw003. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw003>.
- Colombo, S., Arioli, S., Gargari, G., Neri, E., Della Scala, G., Mora, D., 2018. Characterization of airborne viromes in cheese production plants. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1444–1454. <https://doi.org/10.1111/jam.14046>.
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., Muniesa, M., 2011a. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011b. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>.
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., Jofre, J., 2014a. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* 73, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014b. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* L338, 2005, 1–26.
- Cook, R., Hooton, S., Trivedi, U., King, L., Dodd, C.E.R., Hobman, J.L., Stekel, D.J., Jones, M.A., Millard, A.D., 2021. Hybrid assembly of an agricultural slurry virome reveals a diverse and stable community with the potential to alter the metabolism and virulence of veterinary pathogens. *Microbiome* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01010-3>.
- Council of the European Union, 2020. Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption - Political agreement - Publications Office of the EU.
- Dinleyici, M., Pérez-Brocáu, V., Arslanoglu, S., Aydemir, O., Sevuk Ozumut, S., Tekin, N., Vandenplas, Y., Moya, A., Dinleyici, E.C., 2021. Human milk virome analysis: changing pattern regarding mode of delivery, birth weight, and lactational stage. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13061779>.
- Erginkaya, Z., Turhan, E.U., Tatli, D., 2018. Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iran. J. Vet. Res.* 19, 53–56. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4769>.
- Fernández-Orth, D., Miró, E., Brown-Jaque, M., Rodríguez-Rubio, L., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., González-López, J.J., Muniesa, M., Navarro, F., 2019. Faecal phageome of healthy individuals: presence of antibiotic resistance genes and variations caused by ciprofloxacin treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 74 <https://doi.org/10.1093/jac/dky540>.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Lambert, T., 2005. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Am. Soc. Microbiol.* 49, 2949–2953. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949-2953.2005>.
- García, P., Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x>.
- Garneau, J.E., Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb. Cell Factories* 10 (Suppl. 1), S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>.
- Gomes, F., Henriques, M., 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol.* 72, 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>.
- Gómez-Gómez, C., Blanco-Picazo, P., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Rodríguez-Rubio, L., Cerdà-Cuellar, M., Muniesa, M., 2019. Infectious phage particles packaging

- antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49898-0>.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P., 2016. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>.
- Hernando-Amado, S., Coque, T.M., Baquero, F., Martínez, J.L., 2019. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat. Microbiol.* 49 (4), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>.
- Huh, H., Wong, S., St. Jean, J., Slavev, R., 2019. Bacteriophage interactions with mammalian tissue: therapeutic applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 145, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.003>.
- Imamovic, L., Misiakou, M., van der Helm, E., Panagiotou, G., Muniesa, M., Sommer, M. O.A., 2018. Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain WGS. *Genome Announc.* 6, 5–6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01403-17>.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
- Jebri, S., Rahmani, F., Hmaied, F., 2021. Bacteriophages as antibiotic resistance genes carriers in agro-food systems. *J. Appl. Microbiol.* 130, 688–698. <https://doi.org/10.1111/JAM.14851>.
- Jofre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses. In: Elsevier (Ed.), *Perspectives in Medical Virology*, Vol. 17, pp. 227–249. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7).
- Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., Sip, A., 2020. Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments. *Microorganisms* 8, 1–20. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS811764>.
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2007.06.002>.
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ord, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., ector Arg, H., Berendonk, T., Maria Cavaco, L., Gaze, W., Schmitt, H., Topp, E., Guerra, B., Liebana, E., Stella, P., Peixe, L., Carapeto, R., Empl, M., Kunsagi, Z., Vidal, A., 2021. SCIENTIFIC OPINION Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain EFSA Panel on Biological Hazards (Panel members. EFSA J. 19, 6651. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>.
- Lachmayr, K.L., Cavanaugh, C.M., Kerkhof, L.J., DiRienzo, A.G., Ford, T.E., 2009. Quantifying nonspecific β -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 203–211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>.
- Landers, T.F., Cohen, B., Wittum, T.E., Larson, E.L., 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 127, 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.
- Larrañaga, O., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Gómez-Gómez, C., Blanch, A.R., Rodríguez-Rubio, L., Muniesa, M., 2018. Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ. Int.* 115, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.019>.
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2017. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* 220, 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>.
- Letarov, A., Kulikov, E., 2009. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04143.x>.
- Lood, R., Ertürk, G., Mattiasson, B., 2017. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants - bacteriophages as a much neglected potential Transmission Vehicle. *Front. Microbiol.* 8, 2298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02298>.
- Madera, C., Monjardín, C., Suárez, J.E., 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7365. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7365-7371.2004>.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A., 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>.
- Marcin, L., 2020. Strategies of phage contamination prevention in industry. *Open J. Bacteriol.* 4, 020–023. <https://doi.org/10.17352/OJB.000014>.
- More, S.J., 2020. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. *Ir. Vet. J.* 73, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13620-019-0154-4>.
- Navarro, F., Muniesa, M., 2017. Phages in the human body. *Front. Microbiol.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>.
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B.S., Patwa, R., Dunstan, R.A., Weston, T.A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R.S., Barr, J.J., 2017. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *MBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17>.
- O'Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., Coffey, A., 2019. In: Bacteriophages in food applications: from foe to friend, 10, pp. 151–172. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-032818-121747>.
- Penades, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., Novick, R.P., 2015. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>.
- Picozzi, C., Volponi, G., Vigentini, I., Grassi, S., Foschino, R., 2012. Assessment of transduction of *Escherichia coli* Stx2-encoding phage in dairy process conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 388–394. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.11.031>.
- Pruden, A., Arabi, M., Storteboom, H.N., 2012. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11541–11549. <https://doi.org/10.1021/es302657r>.
- Pujato, S.A., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., 2019. Bacteriophages on dairy foods. *J. Appl. Microbiol.* 126, 14–30. <https://doi.org/10.1111/jam.14062>.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F., Muniesa, M., 2014. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 606–609. <https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13>.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F.E., Andrew, C., Rohwer, F., Gordon, J.L., 2010. Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334–338. <https://doi.org/10.1038/nature09199>.
- Ross, J., Topp, E., 2015. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7905–7913. <https://doi.org/10.1128/AEM.02363-15>.
- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M.H., Azizul Karim Hussani, S.M., 2019. Antibiotic residues in milk: past, present, and future. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 6, 315–332. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>.
- Sambrook, J., Russell, W.D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Society.
- Schmelcher, M., Loessner, M.J., 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4, e28137. <https://doi.org/10.4161/bact.28137>.
- Schneider, C.L., 2017. Bacteriophage-mediated horizontal gene transfer: transduction. *Bacteriophages* 1–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_4-1.
- Suttle, C.A., 2007. Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>.
- The European Parliament and the Council of the European Union, 2003. *Regulation (EC) no 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition*. *Off. J. Eur. Commun.* 46, 29–43.
- The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. EFSA J., 2021. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6490>.
- Thierauf, A., Perez, G., Maloy, A.S., 2009. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol.* 501, 267–286.
- Ventola, C.L., 2019. Antibiotic resistance crisis. *Int. J. Med. Dev. Ctries* 40, 561–564. <https://doi.org/10.24911/ijmdc.51-1549060699>.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U., 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>.
- Von Winttersdorff, C.J.H., Penders, J., Van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., Van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolffs, P.F.G., 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- Wang, M., Xiong, W., Liu, P., Xie, X., Zeng, J., Sun, Y., Zeng, Z., 2018. Metagenomic insights into the contribution of phages to antibiotic resistance in water samples related to swine feedlot wastewater treatment. *Front. Microbiol.* 9, 2474. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02474>.
- Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., de la Fuente-Núñez, C., Wang, S., Lu, X., 2019. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *J. Agric. Food Res.* 1, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100006>.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- WHO, 2017. *Potable Reuse: Guidance for Producing Safe Drinking-water*. *World Health Organ. Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO*.
- WHO, 2018. *Antibiotic resistance [WWW Document]*. URL. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

4.5. Capítulo 5:

Genes de resistencia a antibióticos en partículas fágicas procedentes de los ecosistemas marinos antártico y mediterráneo

Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles from Antarctic and Mediterranean Seawater Ecosystems

Pedro Blanco-Picazo, Gabriel Roscales, Daniel Toribio-Avedillo, Clara Gómez-Gómez, Elisenda Ballesté, Maite Muniesa y Lorena Rodríguez-Rubio

Microorganisms (2020); 8(9), 1–15.

DOI: 10.3390/microorganisms8091293.

Introducción

En las últimas décadas se ha detectado una mayor presencia de antibióticos y de sus metabolitos en el medio ambiente, lo cual está estrechamente relacionado con las actividades humanas debido a un uso intensivo tanto a nivel clínico como veterinario, llegando a convertirse en uno de los principales problemas de salud pública en el siglo XXI (García et al., 2020; Mobarki et al., 2019).

En los medios acuáticos, los antibióticos pueden acabar tanto en aguas superficiales como subterráneas, ejerciendo una presión selectiva sobre los microorganismos ambientales y la microbiota de animales acuáticos, influyendo en la aparición y diseminación de GRAs (Carvalho & Santos, 2016; Kraemer et al., 2019).

La creciente demanda, en los últimos años, de productos pesqueros ha derivado en una intensiva producción piscícola, aumentando el riesgo de enfermedades infecciosas en peces, y con ello, un mayor uso de antimicrobianos en acuicultura. Este aumento en el uso de antimicrobianos tiene como consecuencia su acumulación en los tejidos de pescados y mariscos, lo que contribuye a la aparición de bacterias resistentes en la microbiota de los peces (Santos & Ramos, 2018). Previamente ya se ha demostrado la presencia de antibióticos y GRAs en ambientes acuáticos con un alto impacto antropogénico (Calero-Cáceres et al., 2017). Sin embargo, existe muy poca información sobre la presencia de GRAs en áreas con un bajo impacto humano, como las aguas de regiones polares (Miller et al., 2009; Tan et al.,

2018), y hasta la fecha no hay evidencias de la presencia de bacteriófagos con GRAs en estas zonas prístinas.

Objetivos

Con el objetivo de esclarecer el rol de los fagos en la transmisión de resistencias en ambientes naturales y el impacto que ejerce la actividad humana, en este estudio se evaluó su presencia en dos ambientes diferentes, uno con un bajo impacto humano, como son las aguas del océano Antártico, y otro con un alto impacto antropogénico, como son las aguas de la costa mediterránea. Además, debido al bajo impacto humano en el área antártica, se estudiaron fagos inducidos de poblaciones bacterianas de aguas de la Antártida como posible origen de la presencia de partículas fágicas con GRAs en estas áreas prístinas. Finalmente, para evaluar el impacto de la presencia de partículas fágicas con GRAs en aguas mediterráneas en la cadena alimentaria, el estudio se completó con el análisis de GRAs en la fracción de ADN fágico en pescados y mariscos.

Resultados y discusión

El impacto de la actividad humana y el papel de los fagos en la transmisión de GRAs, incluso en áreas remotas con un impacto humano mínimo, se evaluó mediante el análisis de 5 GRAs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *sul1* y *tetW*) en la fracción de ADN fágico de muestras de agua de mar antárticas y mediterráneas, detectándose GRAs en partículas fágicas de ambos grupos de muestras (Fig. 2).

Al tratarse de un área con poca o nula actividad humana, se esperaba encontrar un bajo porcentaje de positivos para GRAs en la fracción de ADN fágico de aguas antárticas. Sin embargo, se detectó un número menor de positivos (25-60% menos) en las aguas mediterráneas que en las antárticas (Fig. 2A), destacando al gen *bla*_{TEM} y *sul1* como los más prevalentes en ambos grupos, detectándose en el 100% de las aguas antárticas analizadas. Estos resultados confirman la presencia de GRAs en áreas remotas con un impacto humano mínimo. Previamente ya se había detectado la presencia de GRAs en comunidades bacterianas de regiones polares (Hernández et al., 2012), coincidiendo como los más prevalentes los genes que proporcionan resistencia a β -lactámicos. Sorprende el elevado número de muestras positivas para *sul1* en aguas antárticas, al tratarse de un gen que proporciona resistencia a sulfonamidas (antibióticos sintéticos o semisintéticos). Sin embargo, este gen se ha asociado con un integrón, lo que explicaría su amplia distribución incluso en ausencia de una presión selectiva de este antibiótico (Jiang et al., 2019), y no debería considerarse como un indicador de la actividad humana, ya que se ha detectado en bacterias ambientales procedentes de suelos y aguas, y también en la Antártida (Na et al., 2019). Además, en un estudio reciente se detectaron resistencias a estos antibióticos en aguas

antárticas extraídas de zonas cercanas a las bases de investigación (Jara et al., 2020), y aunque las muestras de este estudio no pertenecen a áreas cercanas a bases humanas, el crecimiento de la actividad humana en esta zona, mediante expediciones científicas, militares y turísticas (Tin et al., 2009), puede contribuir a una mayor diseminación de resistencias de origen humano (Hernández et al., 2012). También se debe considerar las migraciones de la fauna salvaje, siendo capaces de conectar estas áreas remotas con zonas con actividad antropogénica, actuando como vectores en la transmisión de bacterias resistentes y de GRAs en la Antártida (Allen et al., 2010).

Estos resultados confirman la diversidad de GRAs presente en áreas prístinas, como la Antártida, y el papel de los bacteriófagos como potenciales vehículos en la transmisión de GRAs entre las comunidades bacterianas en ecosistemas marinos, hecho que ya se ha demostrado en comunidades de cianobacterias, donde los fagos intervienen en la diseminación de genes claves en la fotosíntesis oxigénica de estas bacterias (Lindell et al., 2004). Además, se ha demostrado la presencia de GRAs en poblaciones bacterianas extraídas de permafrost, lo que apoya la ocurrencia de resistencias a antibióticos en épocas previas a la aparición humana (D'Costa et al., 2011).

En contraste con los datos de prevalencia, la abundancia o número de CG de GRAs por litro de agua de mar de la Antártida fue de 3-5 unidades \log_{10} inferior a la detectada en aguas mediterráneas. En el Mediterráneo los genes *bla*_{TEM} y *tetW* fueron los más abundantes, con valores medios cercanos a 10^7 CG/L, mientras que en aguas antárticas, *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M-1} fueron los más abundantes con valores cercanos a 10^3 CG/L. En un estudio realizado en viromas procedentes de diferentes regiones marinas (Calero-Cáceres & Balcázar, 2019), se detectó una menor diversidad de GRAs en la fracción fágica en zonas con mayor impacto humano, pero algunos de ellos (como *bla*_{TEM} y *tetW*) se encontraron a concentraciones muy elevadas, similar a lo ocurrido en la costa mediterránea. A pesar de que todavía no se ha establecido una clara asociación, estos resultados ponen de manifiesto que la presión selectiva ejercida por los humanos en ecosistemas naturales, si bien no tiene un efecto en la prevalencia de los GRAs en partículas fágicas, sí que tiene un efecto en una mayor abundancia.

El posible origen de las partículas fágicas con GRAs detectadas en el área antártica podrían ser las comunidades bacterianas de la misma región como parte de mecanismos de TGH. Para verificarlo, se separó la fracción bacteriana de las muestras (extraída a partir de 1 litro de agua antártica) y se trataron con un agente inductor para provocar la producción de partículas fágicas. En el análisis de GRAs en el ADN fágico, se detectó el gen *bla*_{TEM} en el 100% de las partículas fágicas inducidas (Fig. 3), seguido del gen *bla*_{CTX-M-1} (75% de las

partículas inducidas). Todos los genes detectados presentaron un número de copias genómicas de un orden similar (Fig. 3). Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución, debido a que se seleccionaron las comunidades bacterianas capaces de crecer en medio marino (*marine broth*), por lo que podrían existir partículas fágicas capaces de inducirse bajo otras condiciones. No obstante, la detección de GRAs en la fracción de ADN fágico procedente de lisógenos de bacterias antárticas sugiere a las comunidades bacterianas como una fuente de partículas fágicas con GRAs, debiendo formarse estas partículas tras el empaquetamiento de ADN bacteriano (incluidos GRAs) por los profagos insertados en el cromosoma bacteriano. Además, se ha detectado que los fagos priorizan la lisogenia cuando la concentración bacteriana es baja (Brum et al., 2016), como en el caso de las comunidades bacterianas antárticas, donde existe una amplia distribución de fagos atemperados.

La elevada concentración de partículas fágicas con GRAs detectadas en el área mediterránea puede tener importantes consecuencias sobre la fauna marina, así como sobre los consumidores de productos pesqueros, que pueden adquirirlas a través de la cadena alimentaria. Para evaluar su impacto en la costa mediterránea, se determinó la presencia de partículas fágicas con GRAs en diferentes tipos de pescados (frescos de origen mediterráneo y atlántico; procedentes de piscifactoría; pescados congelados) y mariscos. En este estudio, además de los cinco GRAs analizados en las muestras de aguas, se incluyeron otros seis GRAs (*bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *armA*, *mecA*, *qnrA* y *qnrS*). También se evaluó la capacidad infectiva de las partículas fágicas presentes en las muestras mediante un estudio de propagación, utilizando como huésped una cepa de *E. coli* (WG5), debido a que no contiene profagos ni ninguno de los GRAs analizados. Se considera que ha habido propagación si se observa un incremento de positivos para GRAs tras el paso de enriquecimiento, indicándonos que las partículas fágicas han sido capaces de infectar la cepa huésped y propagar.

Los genes que proporcionan resistencia a β -lactámicos y *tetW* se detectaron en todas las muestras (Fig. 4), siendo el gen *bla_{TEM}* el más prevalente, con un 90-100% de muestras positivas, y el que presentó un mayor número de CG, con valores medios superiores a 10^6 CG/25 gramos (Fig. 5), seguido del gen *bla_{CTX-M-1}*, detectado en un 10-80% de las muestras, pero a una concentración inferior a 10^5 CG/25 gramos (Fig. 5). El gen *tetW* se detectó en el análisis directo en un 30-90% de las muestras, presentando la mayor prevalencia en muestras de pescado congelado (Fig. 4), con valores de abundancia cercanos a 10^6 CG/25 gramos, reflejando el uso masivo de este tipo de antibióticos y su potencial dispersión al ambiente (Tamminen et al., 2011).

Las muestras de pescado mediterráneo y de pescado congelado fueron las que presentaron la mayor diversidad, con la detección de siete GRAs en cada una. Tras el paso de

enriquecimiento se detectó un incremento de positivos para cinco GRAs en pescados mediterráneos (Fig. 4), indicando que parte de las partículas fágicas que contienen GRAs son infecciosas y capaces de propagar en la cepa huésped.

Los indicadores microbianos confirman el impacto de la actividad humana en aguas de mar Mediterráneo, pescados y mariscos, detectándose aerobios totales resistentes a ampicilina en todas las muestras analizadas (Tabla 1), colifagos somáticos, utilizados como indicador de contaminación fecal vírico, en todos los grupos de muestras (excepto en pescados mediterráneos), y otros indicadores de contaminación fecal, como *Enterococcus spp.* y *E. coli* (Tabla 1). La detección en la microbiota de peces y mariscos de un elevado número de resistencias a antibióticos β -lactámicos puede representar un riesgo directo sobre la salud, e indirecto si estas resistencias son transferidas a la propia microbiota humana. A pesar de ello, según la normativa europea en materia de seguridad alimentaria, todas las muestras de pescados y mariscos analizadas fueron consideradas aptas para su consumo. La detección de bacteriófagos, incluidos aquellos capaces de transferir GRAs, no está contemplado en las normativas de seguridad alimentaria, por lo que no existe ninguna legislación que controle la dispersión de resistencias o de GRAs, ni los mecanismos implicados en su movilización.

Conclusiones

Con este estudio se confirma la presencia de partículas fágicas con GRAs en ambientes marinos tanto con bajo como con alto impacto antropogénico, actuando ambos ambientes como reservorios de GRAs y demostrando que los GRAs y su presencia en partículas fágicas es anterior a la actividad humana, jugando los fagos un papel importante en su transmisión. Las poblaciones bacterianas naturales son el posible origen de los fagos con GRAs detectados en la Antártida. Se confirma que la actividad humana tiene un claro impacto en una mayor concentración de los GRAs detectados en el área mediterránea en comparación con el área antártica, desencadenando una mayor influencia en la microbiota de pescados y mariscos, lo que contribuye a una mayor diseminación de estos GRAs en comunidades microbianas de especial relevancia en salud pública.



Article

Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles from Antarctic and Mediterranean Seawater Ecosystems

Pedro Blanco-Picazo ¹, Gabriel Roscales ¹, Daniel Toribio-Avedillo ¹, Clara Gómez-Gómez ¹, Conxita Avila ² , Elisenda Ballesté ¹ , Maite Muniesa ^{1,*} and Lorena Rodríguez-Rubio ^{1,*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain; p.blanco@ub.edu (P.B.-P.); gascheb@gmail.com (G.R.); d.toribio.avedillo@ub.edu (D.T.-A.); claragg1995@gmail.com (C.G.-G.); eballest@ub.edu (E.B.)

² Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences (BEECA), Faculty of Biology, and Biodiversity Research Institute (IrBIO), University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain; conxita.avila@ub.edu

* Correspondence: mmuniesa@ub.edu (M.M.); lorenarodriguez@ub.edu (L.R.-R.)

Received: 29 July 2020; Accepted: 19 August 2020; Published: 24 August 2020



Abstract: Anthropogenic activities are a key factor in the development of antibiotic resistance in bacteria, a growing problem worldwide. Nevertheless, antibiotics and resistances were being generated by bacterial communities long before their discovery by humankind, and might occur in areas without human influence. Bacteriophages are known to play a relevant role in the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environments. In this study, five ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *sul1* and *tetW*) were monitored in phage particles isolated from seawater of two different locations: (i) the Mediterranean coast, subjected to high anthropogenic pressure, and (ii) the Antarctic coast, where the anthropogenic impact is low. Although found in lower quantities, ARG-containing phage particles were more prevalent among the Antarctic than the Mediterranean seawater samples and Antarctic bacterial communities were confirmed as their source. In the Mediterranean area, ARG-containing phages from anthropogenic fecal pollution might allow ARG transmission through the food chain. ARGs were detected in phage particles isolated from fish (Mediterranean, Atlantic, farmed, and frozen), the most abundant being β -lactamases. Some of these particles were infectious in cultures of the fecal bacteria *Escherichia coli*. By serving as ARG reservoirs in marine environments, including those with low human activity, such as the Antarctic, phages could contribute to ARG transmission between bacterial communities.

Keywords: bacteriophages; shellfish; fish; transduction; ARG; horizontal gene transfer

1. Introduction

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to public health this century. The growing environmental presence of antibiotics and their derivative metabolites is mainly due to anthropogenic activities, such as medicine, agriculture, and industry. Antibiotics have been overused both in clinical settings and the livestock industry, including for prophylaxis, although their use as growth supplements has been prohibited in Europe since 2006 (EC Regulation No. 1831/2003) [1–3]. Epidemiological studies have verified that antibiotic consumption is directly connected with the emergence and dissemination of resistances [2].

Depending on their transport and persistence in soil or water, antibiotics can spread to surface water and groundwater, exerting a selective pressure on aquatic bacteria and the microbiota of aquatic animals, and leading to the emergence of resistant bacteria and the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) [4,5].

A high demand for fish products has led to an increase in aquaculture in recent years [6]. However, these intensive fish production systems, with high concentrations of animals kept in limited areas of water, entail an increased risk of infectious diseases and consequently depend on the prophylactic and metaphylactic use of antimicrobials [6]. In addition to the antibiotic contamination of water bodies, which exerts a selective pressure on aquatic microbial communities, their use in the aquaculture industry causes the accumulation of antibiotic residues in fish and shellfish tissues, which in turn selects for resistances in the fish microbiota [6]. Although the presence of antibiotics, and consequently ARGs, in aquatic environments subjected to a high anthropogenic impact is well established [7], there is less information available about ARGs in areas with few human activities, such as polar aquatic environments, where ARGs have been detected [8,9].

Microorganisms have been producing natural antibiotics for billions of years to gain a selective advantage over competitors [2], and they simultaneously evolved mechanisms of antibiotic resistance [2]. As well as intrinsic resistance to antibiotics, innate to the species, bacteria may acquire resistance by mutation or by horizontal gene transfer (HGT) [3]. The most studied HGT mechanisms are conjugation and transformation, although in recent years, transduction, or gene transfer mediated by bacteriophages or phages, has attracted increasing attention as a means of ARG transmission in the environment [10,11].

Bacteriophages are the most abundant entities in the world (10^{31} phage particles have been estimated) and can be isolated from any habitat where bacteria exist [12]. The high persistence of phages in the environment enhances the efficiency of ARG dissemination in phage particles, which could, in turn, increase the chances of ARG transduction [13]. Phages can mobilize and spread ARGs by transduction, whether generalized, specialized, or lateral [14–16]. Phage particles carrying ARGs have been reported in different biomes, including sludge, soil, wastewater [10,11,15,17,18], marine viromes [19], and human and animal biomes [20–22]. Recent studies have reported the presence of ARG-carrying phage particles in vegetables and meat products classed as suitable for consumption, confirming that they can end up in food, and suggesting that their presence in feces is due to the fecal-oral route [23,24].

There is, however, no information about the occurrence of phage-associated ARGs in areas with very low human activity. The aim of this study was to assess ARG-carrying phage particles in two different environments: (i) Mediterranean coastal water, subjected to a high anthropogenic impact and (ii) Antarctic seawater, where the anthropogenic impact is low. Considering the negligible human influence in the Antarctic area, we also examined if phages induced from the bacterial fraction of marine communities could be confirmed as the source of the ARG-containing phage particles. Additionally, the impact of ARG-containing phage particles in Mediterranean seawater on the food chain was studied by analyzing their presence in marine fish, shellfish, and farmed fish.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Twenty seawater samples were collected from eleven different sampling sites (Med-1 to Med-11) off the Barcelona coast in February–October 2019 (Figure 1a). Ten seawater samples were collected at different sites off Livingston Island, the South Shetland Islands (LIV-1,2,3,4,5) near the Antarctic Spanish Base, and the Antarctic Peninsula (SW1, SW8, SW10, BISP and ROT) while on board the research vessel BIO Hespérides during the BLUEBIO-2 Antarctic Campaign (January–March 2019) within the Bluebio project (CTM2016-78901/ANT; Figure 1b). Antarctica seawater samples were not close to human bases or animal communities. Additionally, 50 samples of shellfish ($n = 10$ samples), Mediterranean fish ($n = 10$), Atlantic fish ($n = 10$), frozen fish ($n = 10$), and farmed fish ($n = 10$) were obtained in local supermarkets during 2018–2019. All the samples were collected in sterile containers, kept at 4 °C and analyzed within 24 h.



Figure 1. Seawater sampling sites. (a) Barcelona coast (Mediterranean Sea). (b) Livingston Island (Antarctica). Stars represent the sampling sites in each area.

2.2. Phage Isolation from Seawater Samples

Five liters (L) of Antarctic seawater samples were filtered by 5 μm Swinnex[®] filter holders (Millipore, Merck, Darmstadt, Germany), followed by filtration through 3 μm mixed cellulose ester membranes (MCE) (Merck), and filtration through 0.2 μm Isopore[™] polycarbonate membranes. Phage particles from the final filtrate were recovered by chemical flocculation [25]. An iron chloride solution (10 g/L) was used to flocculate the viral particles in the sample, which were then recovered by filtration through 1.2 μm Isopore[™] membranes. Viral particles retained in the filters were resuspended using a 0.1M EDTA-0.2M MgCl_2 -0.2M ascorbic acid buffer to a final volume of 5 mL.

For Mediterranean seawater samples, 100 mL was filtered through 0.22 μm low protein binding polyethersulfone (PES) membranes. Viral particles in filtered samples were then concentrated with PEG8000 following previously reported protocols [18,26].

Lastly, the suspensions of phages of both origins were dialyzed and concentrated with Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters to volumes of 0.5 mL. The concentrated phage suspensions of both origins were used for the phage DNA extraction.

2.3. Phage Isolation from Induced Antarctic Bacterial Communities

Antarctic seawater samples were processed within 48 h after collection for phage induction from the bacterial communities. One liter of each sample was filtered by 0.2 μm Isopore[™] polycarbonate membranes (Merck) to retain the marine bacterial communities. In order to enrich the bacterial communities, filters were incubated in 7 mL of Difco[™] Marine Broth at 18 °C for 48–72 h without shaking. Phages were induced from the possible lysogens present in these bacterial communities by treatment with mitomycin C (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubation overnight at 20 °C in the dark without shaking [27]. After induction, phages were purified by filtration through 0.22 μm low protein binding PES membranes and concentrated with Amicon[®] Ultra 15 mL centrifugal filters as described above. The suspensions were stored at -20 °C until processed for phage DNA extraction.

2.4. Phage DNA Extraction

As in previous studies [23,24], filtered and concentrated phage suspensions were treated with chloroform (1:10 (v/v)) to rule out the possible presence of vesicles containing DNA, vigorously vortexed for 5 min and centrifuged at $16,000\times g$ for 5 min. The aqueous phase was incubated with DNase I

(100 units/mL) to eliminate any free DNA in the samples outside the phage particles. DNase was inactivated by heating for 5 min at 75 °C.

These suspensions were then used to extract DNA from the phage capsids. Before breaking the capsids, aliquots were taken to confirm DNA removal by the DNase treatment and complete inactivation of DNase by heat treatment.

Viral capsids were broken using proteinase K (0.5 µg/mL) in 250 µL of proteinase K buffer and then incubated for 1 h at 55 °C [26]. The encapsidated DNA was extracted by phenol-chloroform (1:1) (*v/v*) and chloroform treatment. DNA was precipitated using 100% ethanol and 3 M sodium acetate and resuspended in 50 µL of ultrapure sterile water. DNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

2.5. Amplification of ARGs in the DNA Extracted from Phage Particles

Quantitative real-time PCR (qPCR) with TaqMan hydrolysis probes was performed using the StepOne Real Time PCR System in a 20 µL reaction mixture with the TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reaction contained 9 µL of the sample DNA or standards with known DNA concentration. The results were analyzed with the Applied Biosystems StepOne™ Instrument program.

A total of 11 ARGs with a range of mechanisms and clinical relevance were evaluated. Five genes conferred resistance to β-lactam antibiotics (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *bla*_{OXA-48} and *bla*_{VIM}), two quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*), *mecA*, a gene commonly found in *Staphylococcus* that confers resistance to methicillin [15], *sul1*, which confers resistance to sulfonamides and is frequently found in environmental and clinical bacterial populations [28], *tetW*, which confers resistance to tetracycline and is commonly found and used in aquaculture environments [29], and *armA*, which encodes aminoglycoside resistance and is widely distributed in *Enterobacteriaceae* [30]. Mediterranean and Antarctic seawater samples were tested for the presence of five ARGs only (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1 group}, *bla*_{CTX-M-9 group}, *tetW* and *sul1*), and the fish samples were analyzed for the eleven ARGs.

For quantification, serial dilutions of gBlocks™ Gene Fragments (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) of known concentration were used to generate the standard curves. All samples were run in triplicate (including the standards and negative controls). The number of gene copies (GC) was defined as the mean of the triplicate data obtained. To quantify the ARGs, we considered the results obtained within the threshold cycle and within the limit of quantification. This was determined by the last valid threshold cycle for each ARG assay (GC/µL are shown in Table S1) in the standard curve that is consistent in the diverse replicates.

To confirm that only the ARGs from the phage particles were evaluated, several controls were performed as previously described [24]. Briefly, an aliquot of each sample after DNase treatment and before desencapsidation was included in the qPCR in parallel with the DNA sample to confirm the absence of each ARG. Additionally, the controls were used to confirm the absence of bacterial 16S rDNA, which was verified by qPCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and primers 338F/518R (Table S1).

2.6. Bacterial and Viral Indicators

Microbial indicators were evaluated in fish samples and Mediterranean seawater. To isolate bacteria and somatic phages from fish and shellfish samples, 20 g of each sample was homogenized for 2 min in 60 mL of phage buffer with the Stomacher homogenizer (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Germany). Stomacher bags with filters (Afora, Barcelona, Spain) were used to enhance the separation of solid waste from the liquid fraction containing the microorganisms. For Mediterranean seawater, 100 mL of each sample was filtered through 0.45 µm mixed cellulose ester (MCE) EZ-Pak® filters (Merck), which were used to analyze the bacterial indicators. Somatic coliphages were analyzed as indicated below.

Total aerobic microorganisms resistant to ampicillin (Amp^R) were evaluated on Tryptone Soy Agar (TSA) with Amp (100 µg/mL) at 37 °C. Total *Escherichia coli* and *E. coli* resistant to Amp were determined on Chromocult[®] Coliform Agar or Chromocult[®] Coliform Agar with Amp (100 µg/mL), respectively. Incubation was first performed for 2 h at 37 °C to accommodate potentially damaged microorganisms and then overnight at 44 °C. Presumed *E. coli* colonies were confirmed in MacConkey agar. Total *Enterococcus* were enumerated by membrane filtration, according to the ISO standard method [31]. Filters were incubated for 48 h at 37 °C in Difco[™] *Enterococcus* agar (BD). Suspected *Enterococcus* colonies were confirmed by growing them in bile esculin agar for 3 h at 44 °C.

Somatic coliphages were evaluated as fecal viral indicators in the samples [32]. The homogenates of fish and shellfish samples (10 mL each) were centrifuged for 15 min at 4000× *g* and the supernatant was filtered through 0.22 µm low protein binding PES membranes (Merck). Seawater samples (100 mL) were filtered through 0.22 µm low protein binding PES membranes (Merck) and concentrated with Amicon[®] Ultra 15 mL centrifugal filters (Merck). The filtrates were analyzed in duplicate for the presence of somatic coliphages according to the ISO standard method [33], which uses *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) as the bacterial host, and incubated at 37 °C for 18 h.

Each sample was analyzed for all the indicators in duplicate.

2.7. Propagation Cultures for Phages in Fish and Shellfish Samples

The ability of phage particles in the fish and shellfish samples to infect and propagate in enrichment cultures of the *E. coli* WG5 host strain was evaluated. This strain, used for the somatic coliphage count, was selected for its sensitivity to phage infection [23] and because it does not contain any of the ARGs targeted in this study or any prophage [34].

The propagation cultures were prepared with 1 mL of each phage suspension after the DNase treatment and 1 mL of *E. coli* WG5 at the exponential phase (OD₆₀₀ 0.3) in 8 mL of Luria-Bertrani broth (LB) and incubated overnight at 37 °C with shaking. After incubation, phages were purified by filtration through 0.22 µm low protein binding PES membranes and treated with chloroform and DNase, as indicated above.

The infectivity of the phage particles carrying ARGs was evaluated using qPCR by comparing ARG abundance in packaged DNA before (direct quantification from the sample) and after phage propagation in the enrichment cultures. If the GC number of the ARGs in the phage particles increased after propagation, it was considered that the phage particles in this sample were able to infect and propagate in the host strain. Otherwise, if ARG levels did not vary or decreased, the particles in this sample were considered incapable of propagating.

3. Results

3.1. Comparison of ARGs in the Phage DNA Fraction from Mediterranean and Antarctic Seawater Samples

ARGs were detected in the phage DNA fraction isolated from Mediterranean and Antarctic seawater (Figure 2). For the five ARGs studied in both types of seawater, 25–60% fewer positive samples were obtained from the Mediterranean than the Antarctic (Figure 2a). *bla*_{TEM} was the most prevalent ARG in both sites, found in 100% of Antarctic and 75% of Mediterranean samples (Figure 2a). *sul1* was also found in 100% of Antarctic samples, but its prevalence in Mediterranean waters was much lower (40%). The second most prevalent ARG in the Mediterranean was *bla*_{CTX-M-1} (45%) but much less than in the Antarctic (80%) (Figure 2a).

In contrast with the prevalence data, the abundance of ARGs (GC/L) in the Antarctic samples was 3–5 log₁₀ units lower than in the Mediterranean samples (Figure 2b). *bla*_{TEM} and *tetW* were the most abundant ARGs found in the Mediterranean, with average values close to 7 log₁₀ GC/L, while *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M-1} were the most abundant in the Antarctic, with average values close to 3 log₁₀ GC/L.

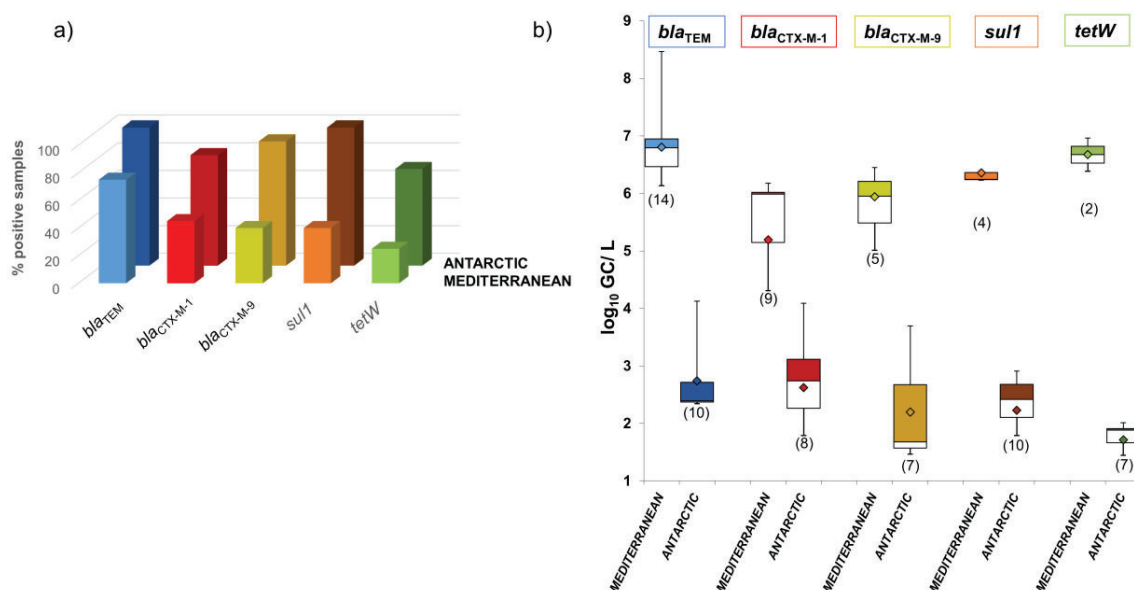


Figure 2. Antibiotic resistance genes (ARGs) in phage particles in Mediterranean and Antarctic seawater samples. (a) Percentage of positive samples for each ARG. (b) Abundance of each ARG in seawater (\log_{10} GC/L). Data are represented in boxplots; the diamond represents the average value of the positive samples, the upper squares include samples whose values are within the 75th percentile, and those in the lower white boxes are within the 25th percentile.

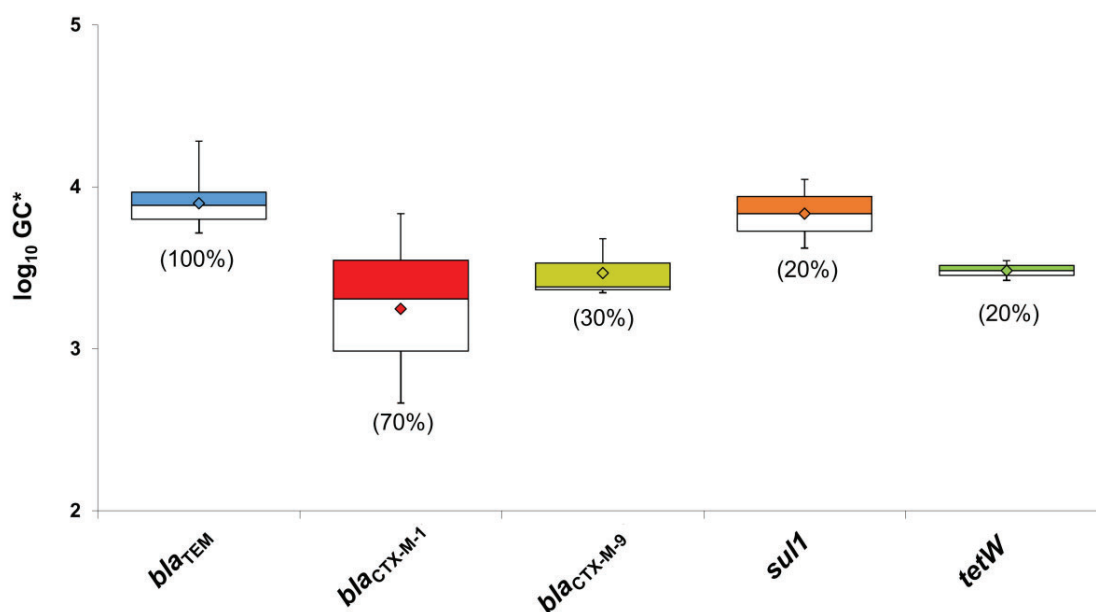
3.2. ARGs in Phage Particles Induced from Antarctic Bacterial Communities

As mentioned, one of the aims of the study was to explore the origin of the ARG-containing phage particles found in the Antarctic area. We hypothesized that they could be produced by the Antarctic marine bacterial communities as part of an HGT mechanism. To test this hypothesis, the bacterial fraction of the samples was separated and treated with an inducing agent to force the production of phage particles, including those carrying ARGs. The results showed that particles carrying *bla*_{TEM} were produced in 100% of the lysates, and particles carrying *bla*_{CTX-M-1} group were produced in 75% (Figure 3). Other ARG-containing particles were produced in a lower percentage but were still detectable.

The Antarctic ARG counts were calculated from phage particles induced from marine bacteria isolated from 1 L of seawater. Nevertheless, this abundance should be treated with caution, as the cultivation of the bacterial communities using marine broth selected the bacteria able to grow in such conditions. In addition, different phage particles may be induced at different rates. Finally, the integrity of phage particles could have been compromised during their storage from the end of the sampling campaign until phage DNA extraction in the laboratory. Despite these considerations, all ARGs in the induced phages were detected with a similar abundance. These results point to the marine bacterial communities as a plausible source of the ARG-carrying phage particles found in the Antarctic seawater.

3.3. Consequences of Anthropogenic Pollution in Mediterranean Environments

The higher abundance of ARG-carrying phage particles in the Mediterranean could be attributed to the anthropogenic impact as well as production by the bacterial communities. These particles could be taken up by aquatic fauna and mediate the transfer of ARGs through the food chain. To evaluate the consequences of the ARG-carrying phage particles in Mediterranean coastal waters, a set of samples of marine fish, shellfish, and farmed fish from the area were analyzed.



*Phages induced from Antarctic marine bacterial communities in 1 L of Antarctic seawater

Figure 3. Abundance of ARGs in the phage DNA isolated from phage particles induced from Antarctic bacterial communities present in one liter of Antarctic seawater (\log_{10} GC/L). Data are represented in boxplots; the diamond represents the average value of the positive samples, the upper squares include samples whose values are within the 75th percentile, and those in the lower white boxes are within the 25th percentile.

The microbial indicators confirmed the influence of anthropogenic pollution in seawater and in fish samples. Aerobic bacteria resistant to ampicillin were detected in all the matrices analyzed (Table 1). Predictably, the highest positive values of *E. coli* were obtained in Mediterranean seawater samples, which contained ampicillin-resistant *E. coli*. The similarity of the average values of *E. coli* and ampicillin-resistant *E. coli* in the Mediterranean samples suggests that most of the *E. coli* isolates were ampicillin-resistant. Other fecal indicators, *Enterococcus* spp., were also present in all the samples studied (Table 1), their abundance in Mediterranean seawater and fish being similar to *E. coli* counts. Somatic coliphages, used as viral indicators of fecal pollution [35], were detected in all samples except in Mediterranean fish.

3.4. Prevalence of ARGs in Phage DNA Fraction Isolated from Shellfish and Fish Samples

ARGs in DNA extracted from phage particles isolated from shellfish and fish were quantified by qPCR. Samples were considered positive when the amplification values of the target gene were within the limit of quantification, previously defined with the standard curves. Those samples outside the limit of quantification but within the limit of detection and those that did not show any increase in fluorescence in the qPCR cycles (undetermined samples) were excluded from the ARG prevalence study.

All samples were analyzed for ARGs, either directly or after propagation in *E. coli* cultures, with 10–100% of samples testing positive (Figure 4). An increase in ARG count in the DNA after the enrichment step revealed that the phage particles were able to infect a fecal strain and propagate, and consequently a fraction of the particles in these samples were infectious. On the contrary, in samples without an increase in GC numbers or no detection of ARGs (not shown in Figure 4), the isolated phage particles were likely non-infectious or the propagation strain was not a suitable host.

Table 1. Bacterial (CFU/25 g) and viral (PFU/25 g) indicators in Mediterranean seawater, fish and shellfish samples. -; only one positive sample, no SD.

Microorganism		Mediterranean Seawater *	Fish				
			Shellfish	Mediterranean	Atlantic	Farm	Frozen
	<i>n</i>	20	10	10	10	10	10
Total aerobic bacteria AmpR	% positive samples	100	90	80	70	100	40
	Average	2.4×10^3	4.6×10^7	5.1×10^4	5.7×10^6	3.8×10^6	1.0×10^8
	SD	5.6×10^3	4.9×10^7	5.9×10^4	9.4×10^6	8.3×10^6	1.2×10^8
<i>E. coli</i>	% positive samples	85	0	10	10	0	0
	Average	6.9×10^2	0	3.7×10^1	7.5×10^1	0	0
	SD	2.1×10^3	0	–	–	0	0
<i>E. coli</i> AmpR	% positive samples	60	0	0	0	0	0
	Average	6.8×10^2	0	0	0	0	0
	SD	1.9×10^3	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	% positive samples	90	30	10	40	20	10
	Average	1.0×10^2	1.4×10^2	7.5×10^1	7.3×10^2	1.9×10^2	1.1×10^2
	SD	1.5×10^2	1.2×10^2	–	1.2×10^3	5.3×10^1	–
Somatic coliphages	% positive samples	40	70	0	30	10	20
	Average	1.0×10^3	1.1×10^3	0	9.2×10^1	7.5×10^1	6.6×10^2
	SD	1.3×10^3	9.9×10^2	0	5.2×10^1	-	8.2×10^2

* CFU or PFU/L.

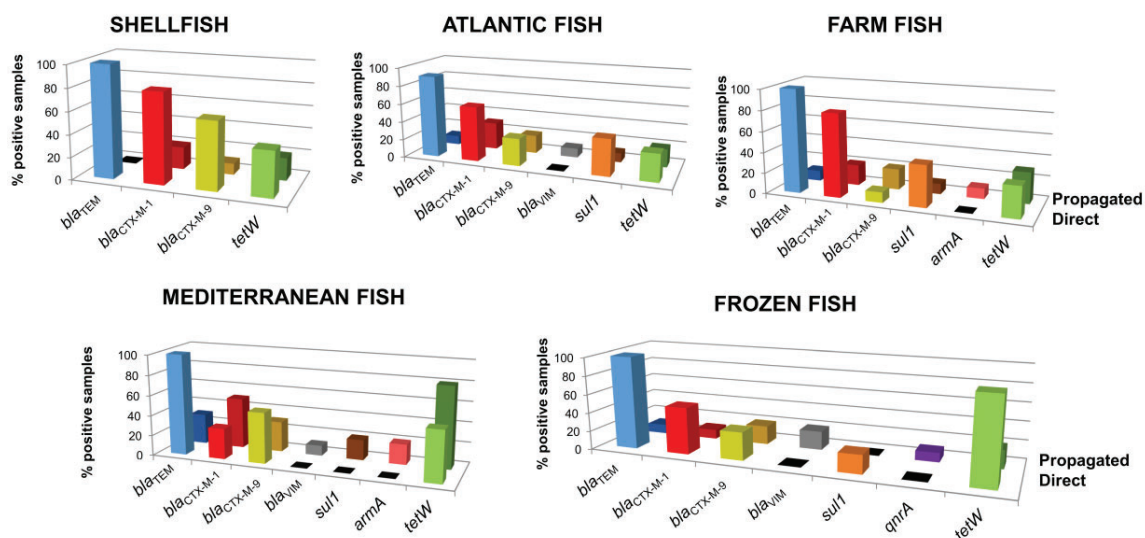


Figure 4. Percentage of positive samples for each ARG in each fish matrix and shellfish analyzed directly from the samples (light color bars) and after propagation in the *E. coli* enrichment culture (dark color bars).

Although the different matrices gave heterogeneous results, β -lactamase genes and *tetW* were the most detected ARGs in all the samples. Among the β -lactamase genes, *bla*_{TEM} was the most prevalent, found in 90–100% of samples, followed by *bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-9}, which were identified in 10–80% of the samples. *bla*_{VIM} was only detected in Atlantic, Mediterranean and frozen fish after propagation. Using direct analysis, *tetW* was detected in 3–90% of the samples, with the highest prevalence in frozen fish. *sul1* was determined in 20–40% of Atlantic, farmed and frozen fish samples by direct analysis and in Mediterranean fish after propagation.

The matrices with the widest range of ARGs were Mediterranean fish and frozen fish (seven in each). After the enrichment step, five ARGs were detected in an increased number of samples of Mediterranean fish, three of them (*bla*_{VIM}, *sul1* and *armA*) only after propagation (Figure 4). The only matrix in which *qnrA* was detected was frozen fish, with one positive sample after propagation, which also tested positive for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{VIM} and *tetW*. *armA* was only detected after propagation in two Mediterranean fish samples and in one farmed fish sample. Finally, *mecA*, *qnrS*, and *bla*_{OXA-48} were not detected in any samples.

3.5. Abundance of ARGs in the Phage DNA Fraction Isolated from Shellfish and Fish Samples

ARG abundance in shellfish and fish was evaluated only by direct analysis of the samples (Figure 5). The abundance of ARGs in phage particles obtained after propagation studies with an enrichment step cannot be considered as an absolute value and was therefore not included in the abundance study.

The most prevalent gene, *bla*_{TEM}, was also the most abundant, with average values higher than $6 \log_{10}$ GC/25 g of sample (Figure 5) and the highest value ($7.9 \log_{10}$ GC/25 g) observed in a farmed fish sample. In contrast, despite being one of the most prevalent ARGs, *bla*_{CTX-M-1} was the least abundant, detected at less than $5 \log_{10}$ GC/25 g in most of the samples tested. The second most abundant ARG was *bla*_{CTX-M-9}, particularly in Mediterranean and frozen fish, with average values close to $6 \log_{10}$ GC/25 g. A similar level of abundance was found for the prevalent gene *tetW*, with the highest value of $6 \log_{10}$ GC/25 g obtained in frozen fish samples, 90% of which were positive for this ARG. The *sul1* gene was detected in both Atlantic and farmed fish at average values higher than $5 \log_{10}$ GC/25 g.

Comparing the abundance of all ARGs in the phage fraction of each type of fish reveals higher values in shellfish, Mediterranean, and Atlantic fish than in farmed and frozen fish, with some exceptions (Figure S1).

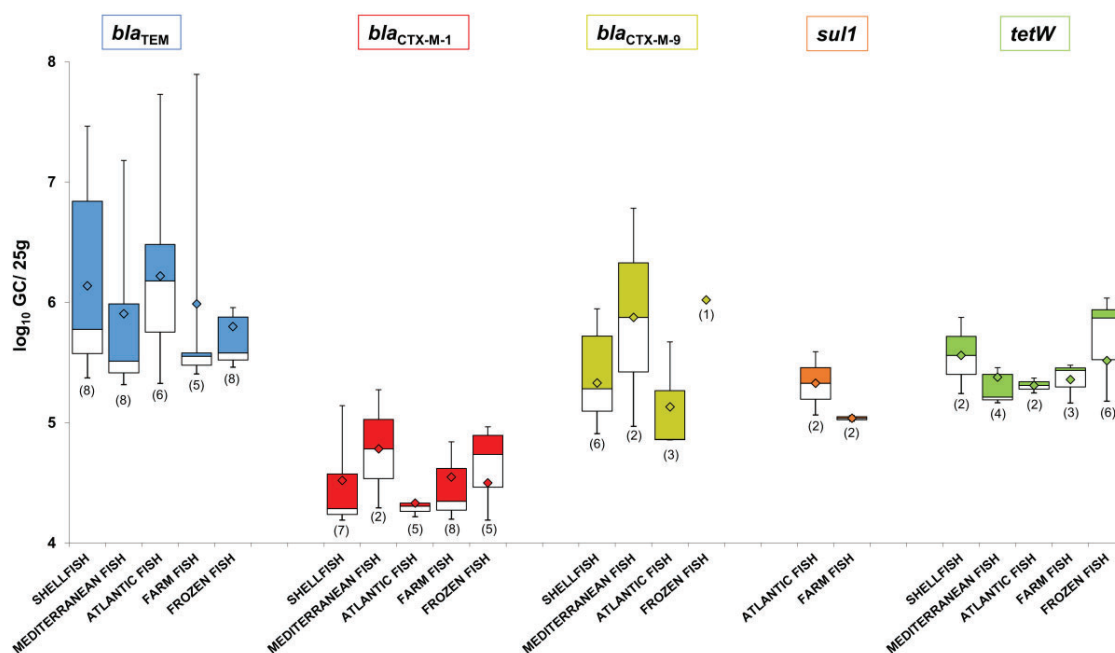


Figure 5. Abundance of ARGs in the DNA isolated from the phage particles of each fish matrix and shellfish (\log_{10} GC/25 g) grouped by ARG. Data is represented in boxplots; the diamond represents the average value of the positive samples, the upper squares include samples whose values are within the 75th percentile, and those in the lower white boxes are within the 25th percentile.

4. Discussion

Antibiotic resistance is as ancient as some of the earliest bacterial communities, but little is known about the presence and persistence of antibiotics in the environment before they were harnessed for the benefit of humanity [36]. Seawater from the Antarctic, an area with a presumably limited anthropogenic influence, was expected to have a low prevalence of ARGs, but surprisingly, it was found to be higher than in Mediterranean samples. An explanation for these results could be the difference in sample volumes analyzed. Following reported protocols for environmental samples [18,25], larger volumes of seawater were collected and processed from the Antarctic to compensate for the expected limited ARG presence. We are aware that the volume affects the limit of detection, and the use of higher volumes of Mediterranean seawater could have led to more positive samples. Nevertheless, when a Mediterranean sample was positive, the abundance of quantified ARGs was much greater than in the Antarctic samples, being around 4 log units more with 50 times less volume, suggesting that ARGs in the Mediterranean samples are unlikely to have been underestimated. Independently of the number of positive samples, the presence of the same ARGs in both ecosystems is striking. In natural ecosystems, the production of antibiotics, innate in many bacterial communities, is a protective mechanism against competitors. In 2011, a study demonstrated the presence of ARGs in bacterial populations isolated from permafrost sediments, supporting that ARGs pre-date the human use of antibiotics and that antibiotic resistance occurs naturally in nature [37].

The most prevalent ARGs in Antarctic seawater were β -lactamase genes and *sul1*, in agreement with previous reports of β -lactamase genes (especially from CTX-M groups) in remote polar areas [38]. There was a notable presence of *sul1*, which expresses resistance to synthetic or semi-synthetic antibiotics such as sulphonamides. A recent study detected resistance against these antibiotics in bacteria recovered from freshwater samples collected close to Antarctic research stations [39], which was attributed to poor waste water treatment. Nevertheless, *sul1* is not necessarily an indicator of human activity, as it is usually present in environmental bacteria from soils and waters, even in the Antarctic [40].

Furthermore, *sul1* is associated with an integron, which could explain its wide dissemination even in the absence of selective pressure by antibiotics [41].

Despite the samples analyzed from Antarctica were not close to human bases, the growing human activity in the Antarctic area, including scientific expeditions, military stations, and tourism [42], could be responsible for disseminating human-origin antibiotic resistance [38]. Another contributing factor may be migrating wildlife, which by connecting anthropogenic and remote areas could act as biological vectors spreading antibiotic resistant bacteria and ARGs to the Antarctic [36].

The greater abundance of ARGs in the Mediterranean samples can be explained by a high antibiotic selective pressure derived from human activity in the Mediterranean coast and the impact of human fecal pollution. These results are in line with the relative abundance of ARGs recently reported by Calero-Cáceres et al., [19] in the viromes of samples from diverse marine habitats. Specifically, the diversity and prevalence of phage ARGs in Indian Ocean samples, like the Mediterranean samples studied here, were relatively low, yet the abundance of certain genes was high, particularly those conferring resistance to β -lactams (especially *bla*_{TEM}) and tetracyclines. Although a clear association has not yet been established, these findings shed light on the selective pressure generated by humans in natural environments, where bacteria can take advantage of phages to spread their genetic content in difficult conditions.

The ARGs detected in the phage DNA fraction isolated from lysogens of Antarctic bacteria allow us to suggest that these bacterial communities are the source of the ARGs in the phage particles. The particles would be formed after the packaging of bacterial DNA (including ARGs) by prophages inserted in the bacterial chromosome. Several studies reveal that temperate phages are widely distributed in Antarctic bacterial communities and prioritize lysogeny when bacterial concentration is low [43].

Our results therefore confirm the existence of a diversity of ARGs in an area as pristine as the Antarctic, and that bacteriophages in marine environments represent a potential vehicle for the horizontal transmission of ARGs between bacterial communities. The role of phages as HGT elements in marine environments has already been demonstrated, as they can disseminate key genes involved in oxygenic photosynthesis in cyanobacteria, which allows various bacterial communities to adapt to surface waters [44]. The demonstrated ability of phages to interact with their hosts has evolutionary and ecological implications.

On the other hand, the high abundance of phage-associated ARGs found in Mediterranean seawater may have important consequences for fish and shellfish, as well as consumers of fishery products. According to our results, fish microbiota showed a high percentage of resistance to β -lactam antibiotics, which represents both a direct health risk to consumers as well as a general health hazard if this resistance is transferred to human microbiota. These results are in accordance with a recent study in which ARGs were detected in wild fish, the most prevalent being *bla*_{TEM} [45].

The most commonly used antibiotics in aquaculture are fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines [29]. The prevalence of *tetW* in our samples may reflect the overuse of tetracyclines in aquaculture and their spread in diverse environments [46]. Although the sulfonamide resistance gene *sul1* has been reported as one of the most prevalent ARGs in phage DNA of environmental and food samples [7,23,24], in the current study it was detected only in a few samples of fish, being more prevalent in farmed fish, in accordance with the use of sulfonamides in aquaculture [47].

European food safety regulations establish that foodstuffs should not contain microorganisms in quantities representing a risk for human health [48]. The samples analyzed in the current study were all suitable for consumption according to the microbiological parameters evaluated. In recreational coastal water, the European normative establishes that 500 CFU/100 mL of *E. coli* and 185 CFU/100 mL of intestinal enterococci in a sample indicate sufficient quality for consumption [49]. However, the detection of phages, including those capable of transferring ARGs to the natural microbiota and pathogens, is not contemplated in food safety practices. There is no legislation in place to control the spread of antibiotic resistance, ARGs, or the genetic elements that mobilize them.

5. Conclusions

This study confirms the presence of ARG-containing phage particles in aquatic environments subjected to a low or high anthropogenic influence, demonstrating that seawater is a reservoir of ARGs and that phages could play an important role in their transmission. In addition, human activity has a clear impact on the evolution of antibiotic resistance, the strongly anthropogenic Mediterranean area showing a higher abundance of ARGs than the relatively pristine Antarctic seawater. This high abundance of ARG-containing phage particles may have an important impact on fish and shellfish microbiota, contributing to the dissemination of those ARGs into microbial communities relevant to human health.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/9/1293/s1>, Figure S1: Abundance of ARGs in the DNA isolated from phage particles in fish and shellfish grouped by fish matrix. Table S1: Oligonucleotides used in this study [50–54].

Author Contributions: M.M., L.R.-R. and E.B. contributed to the conception and design of the study; P.B.-P., G.R., E.B., D.T.-A., C.G.-G. performed experiments and data collection; P.B.-P., G.R., E.B., M.M., L.R.-R., analyzed data; P.B.-P., M.M., L.R.-R. prepared the first draft; M.M., L.R.-R., E.B., C.A. reviewed and edited the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministerio de Innovación y Ciencia (AGL2016-75536-P) and the Bluebio project (CTM2016-78901/ANT), the Agencia Estatal de Investigación (AEI), the European regional fund (ERF), the Generalitat de Catalunya (2017SGR170) and the Centre de Referència en Biotecnologia (XeRBa). P.B.-P. has a grant from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (BES-2017-081296). L.R.-R. is a Serra Hünter Fellow.

Acknowledgments: We thank the “Unidad de Tecnología Marina” (UTM) in the Antarctic Spanish Station in Livingston Island, and the ‘BIO-Hespérides’ crew for their logistic support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Antibiotic Resistance. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (accessed on 8 January 2019).
2. Ventola, C.L. Antibiotic Resistance Crisis. *Int. J. Med. Dev. Ctries.* **2019**, *40*, 561–564. [[CrossRef](#)]
3. García, J.; García-Galán, M.J.; Day, J.W.; Boopathy, R.; White, J.R.; Wallace, S.; Hunter, R.G. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresour. Technol.* **2020**, *307*, 123228. [[CrossRef](#)]
4. Kraemer, S.A.; Ramachandran, A.; Perron, G.G. Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy. *Microorganisms* **2019**, *7*, 180. [[CrossRef](#)]
5. Carvalho, I.T.; Santos, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ. Int.* **2016**, *94*, 736–757. [[CrossRef](#)]
6. Santos, L.; Ramos, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *52*, 135–143. [[CrossRef](#)]
7. Calero-Cáceres, W.; Méndez, J.; Martín-Díaz, J.; Muniesa, M. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environ. Pollut.* **2017**, *223*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Miller, R.V.; Gammon, K.; Day, M.J. Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 37–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tan, L.; Li, L.; Ashbolt, N.; Wang, X.; Cui, Y.; Zhu, X.; Xu, Y.; Yang, Y.; Mao, D.; Luo, Y. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci. Total Environ.* **2018**, *621*, 1176–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Balcazar, J.L. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004219. [[CrossRef](#)]
11. Lekunberri, I.; Subirats, J.; Borrego, C.M.; Balcázar, J.L. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* **2017**, *220*, 981–984. [[CrossRef](#)]

12. Keen, E.C. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays* **2015**, *37*, 6–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Calero-Cáceres, W.; Muniesa, M. Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Res.* **2016**, *95*, 11–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, J.; Quiles-Puchalt, N.; Chiang, Y.N.; Bacigalupe, R.; Fillol-Salom, A.; Chee, M.S.J.; Fitzgerald, J.R.; Penadés, J.R. Genome hypermobility by lateral transduction. *Science* **2018**, *362*, 207–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Colomer-Lluch, M.; Jofre, J.; Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Shousha, A.; Awaiwanont, N.; Sofka, D.; Smulders, F.J.M.; Paulsen, P.; Szostak, M.P.; Humphrey, T.; Hilbert, F. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 4600–4606. [[CrossRef](#)]
17. Calero-Cáceres, W.; Melgarejo, A.; Colomer-Lluch, M.; Stoll, C.; Lucena, F.; Jofre, J.; Muniesa, M. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*. [[CrossRef](#)]
18. Colomer-Lluch, M.; Calero-Cáceres, W.; Jebri, S.; Hmaied, F.; Muniesa, M.; Jofre, J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environ. Int.* **2014**, *73*, 167–175. [[CrossRef](#)]
19. Calero-Cáceres, W.; Ye, M.; Balcázar, J.L. Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 570–577. [[CrossRef](#)]
20. Brown-Jaque, M.; Calero-Cáceres, W.; Espinal, P.; Rodríguez-Navarro, J.; Miró, E.; González-López, J.J.; Cornejo, T.; Hurtado, J.C.; Navarro, F.; Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human feces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2018**, *51*, 434–442. [[CrossRef](#)]
21. Brown-Jaque, M.; Rodríguez Oyarzun, L.; Cornejo-Sánchez, T.; Martín-Gómez, M.T.; Gartner, S.; de Gracia, J.; Rovira, S.; Alvarez, A.; Jofre, J.; González-López, J.J.; et al. Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 856. [[CrossRef](#)]
22. Colomer-Lluch, M.; Imamovic, L.; Jofre, J.; Muniesa, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 4908–4911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Larrañaga, O.; Brown-Jaque, M.; Quirós, P.; Gómez-Gómez, C.; Blanch, A.R.; Rodríguez-Rubio, L.; Muniesa, M. Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ. Int.* **2018**, *115*, 133–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gómez-Gómez, C.; Blanco-Picazo, P.; Brown-Jaque, M.; Quirós, P.; Rodríguez-Rubio, L.; Cerdà-Cuellar, M.; Muniesa, M. Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Poulos, B.T.; John, S.G.; Sullivan, M.B. Iron chloride flocculation of bacteriophages from seawater. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1681*, 49–57. [[CrossRef](#)]
26. Sambrook, J.; Russell, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001; p. 999.
27. Clokie, M.R.J.; Kropinski, A.M. *Bacteriophages Methods and Protocols Volume 2: Molecular and Applied Aspects*; Springer: Berlin, Germany, 2009; Volume 502, ISBN 978-1-60327-564-4.
28. Pruden, A.; Arabi, M.; Storteboom, H.N. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 11541–11549. [[CrossRef](#)]
29. Pereira, A.M.P.T.; Silva, L.J.G.; Meisel, L.M.; Pena, A. Fluoroquinolones and Tetracycline Antibiotics in a Portuguese Aquaculture System and Aquatic Surroundings: Occurrence and Environmental Impact. *J. Toxicol. Environ. Health Part A Curr. Issues* **2015**, *78*, 959–975. [[CrossRef](#)]
30. Galimand, M.; Sabtcheva, S.; Lambert, T. Worldwide Disseminated armA Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *Am. Soc. Microbiol.* **2005**, *49*, 2949–2953. [[CrossRef](#)]
31. ISO. *Water Quality—Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci—Part 2: Membrane Filtration Method*; ISO 7899-2:2000; ISO: London, UK, 2000.

32. Jofre, J. Indicators of Waterborne Enteric Viruses. In *Perspectives in Medical Virology, Volume 17*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 227–249, ISBN 9780444521576.
33. ISO. *Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages—Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*; ISO 10705-2; ISO: London, UK, 2000.
34. Imamovic, L.; Misiakou, M.-A.; van der Helm, E.; Panagiotou, G.; Muniesa, M.; Sommer, M.O.A. Complete Genome Sequence of Escherichia coli Strain WG5. *Genome Announc.* **2018**, *6*. [[CrossRef](#)]
35. Jofre, J.; Lucena, F.; Blanch, A.; Muniesa, M. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water* **2016**, *8*, 199. [[CrossRef](#)]
36. Allen, H.K.; Donato, J.; Wang, H.H.; Cloud-Hansen, K.A.; Davies, J.; Handelsman, J. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 251–259. [[CrossRef](#)]
37. D’Costa, V.M.; King, C.E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.W.L.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **2011**, *477*, 457–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hernández, J.; Stedt, J.; Bonnedahl, J.; Molin, Y.; Drobni, M.; Calisto-Ulloa, N.; Gomez-Fuentes, C.; Astorga-España, M.S.; González-Acuña, D.; Waldenström, J.; et al. Human-associated extended-spectrum β -lactamase in the Antarctic. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2056–2058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jara, D.; Bello-Toledo, H.; Domínguez, M.; Cigarroa, C.; Fernández, P.; Vergara, L.; Quezada-Aguiluz, M.; Opazo-Capurro, A.; Lima, C.A.; González-Rocha, G. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Na, G.; Wang, C.; Gao, H.; Li, R.; Jin, S.; Zhang, W.; Zong, H. The occurrence of sulfonamide and quinolone resistance genes at the Fildes Peninsula in Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* **2019**, *149*. [[CrossRef](#)]
41. Jiang, H.; Cheng, H.; Liang, Y.; Yu, S.; Yu, T.; Fang, J.; Zhu, C. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in Escherichia coli Isolates From Penaeus vannamei and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
42. Tin, T.; Fleming, Z.L.; Hughes, K.A.; Ainley, D.G.; Convey, P.; Moreno, C.A.; Pfeiffer, S.; Scott, J.; Snape, I. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarct. Sci.* **2009**, *21*, 3–33. [[CrossRef](#)]
43. Brum, J.R.; Hurwitz, B.L.; Schofield, O.; Ducklow, H.W.; Sullivan, M.B. Seasonal time bombs: Dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME J.* **2016**, *10*, 437–449. [[CrossRef](#)]
44. Lindell, D.; Sullivan, M.B.; Johnson, Z.I.; Tolonen, A.C.; Rohwer, F.; Chisholm, S.W. Transfer of photosynthesis genes to and from Prochlorococcus viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11013–11018. [[CrossRef](#)]
45. Marti, E.; Variatza, E.; Balcázar, J.L. Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, O456–O459. [[CrossRef](#)]
46. Tamminen, M.; Karkman, A.; Löhmus, A.; Muziasari, W.I.; Takasu, H.; Wada, S.; Suzuki, S.; Virta, M. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 386–391. [[CrossRef](#)]
47. Gao, P.; Mao, D.; Luo, Y.; Wang, L.; Xu, B.; Xu, L. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Res.* **2012**, *46*, 2355–2364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Anonymous Commission Regulations (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2005**, L338/1. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj> (accessed on 23 August 2020).
49. Anonymous Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 Concerning the Management of Bathing Water Quality. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L64/37. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0007&rid=1> (accessed on 23 August 2020).
50. Lachmayr, K.L.; Kerkhof, L.J.; Dirienzo, A.G.; Cavanaugh, C.M.; Ford, T.E. Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (blaTEM) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 203–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Volkman, H.; Schwartz, T.; Bischoff, P.; Kirchen, S.; Obst, U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* **2004**, *56*, 277–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Colomer-Lluch, M.; Jofre, J.; Muniesa, M. Quinolone resistance genes (qnrA and qnrS) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 1265–1274. [[CrossRef](#)]

53. Quirós, P.; Colomer-Lluch, M.; Martínez-Castillo, A.; Miró, E.; Argente, M.; Jofre, J.; Navarro, F.; Muniesa, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 606–609. [[CrossRef](#)]
54. Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 697–703. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5. DISCUSIÓN GENERAL

En un mundo globalizado, como en el que vivimos, todo está conectado. Los grandes avances de la humanidad han permitido mejorar la calidad de vida de las personas y la conexión entre las diferentes regiones del mundo. No obstante, el incremento de la interacción también tiene como consecuencia una mayor propagación y diseminación de patógenos y de enfermedades infecciosas, y hacen que la salud humana, animal y ambiental de un territorio concreto repercute sobre la salud de todo el planeta. Un ejemplo de ello es la crisis sanitaria iniciada el 2019 por la pandemia del virus Sars-CoV-2 (causante de la COVID-19). Este virus de origen zoonótico fue presuntamente transmitido al ser humano debido a una inadecuada manipulación de animales y alimentos, derivando en una expansión global con innumerables repercusiones sanitarias, sociales y económicas (Zhou et al., 2020).

La excelsa capacidad evolutiva de las bacterias les permite adaptarse eficazmente a las posibles adversidades de su entorno, impulsando su supervivencia (Chase et al., 2021). La interacción existente entre las bacterias de los biomas humanos, animales y ambientales, junto con la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos, ha favorecido la dispersión y adquisición de GRAs entre estos ambientes (Lupo et al., 2012).

En los últimos años ha cogido fuerza el papel de los bacteriófagos como vectores en la TGH de genes entre bacterias y, especialmente, ha aumentado el interés de su papel en la transmisión de GRAs (Colavecchio et al., 2017; Gabashvili et al., 2020; Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011; Mohan Raj et al., 2018). En estudios previos a esta tesis se detectaron GRAs en la fracción de ADN fágico en muestras ambientales, humanas y animales, e incluso en alimentos de origen vegetal (Anand et al., 2016; Brown-Jaque et al., 2018a; Calero-Cáceres & Balcázar, 2019; Colomer-Lluch et al., 2011a; Larrañaga et al., 2018; Wang et al., 2018), haciendo plausible que la transducción de GRAs sea un evento de mayor relevancia en la movilización genética bacteriana de lo que inicialmente se pensaba. No obstante, su papel en la movilización de resistencias todavía no está bien establecido. Por ello, en la presente tesis, se intenta profundizar en el estudio de partículas fágicas portadoras de GRAs en biomas humanos, animales y ambientales, centrándonos en los alimentos como vehículos de transmisión de dichas partículas, y así ahondar en su contribución a la movilidad de resistencias, intentando también aportar evidencias de su posible origen en biomas humanos y animales.

La abundancia y diversidad de fagos en el tracto intestinal ya están ampliamente demostradas (Manrique et al., 2016; Zuppi et al., 2022) y diversos estudios basados en las nuevas herramientas de secuenciación también han detectado su presencia en otros tejidos y órganos del cuerpo humano (Edlund et al., 2015; Foulongne et al., 2012; Willner et al., 2009). Además, nuestro grupo de investigación ha descrito la presencia de fagos infecciosos en muestras de

líquido ascítico y orina (Brown-Jaque et al., 2016). Ante estos resultados, en el primer capítulo de esta tesis se quiso ahondar en la diversidad fágica de diversas muestras humanas, y a través de un análisis metagenómico ver si estas partículas fágicas eran portadoras de genes bacterianos y de GRAs.

La elevada presencia de partículas fágicas con capacidad infectiva detectada en los diferentes fluidos analizados, algunos de ellos considerados tradicionalmente como estériles (líquido ascítico, ceforraquídeo y orina), sugiere que ha tenido que ocurrir algún proceso de traslocación, posiblemente desde el tracto intestinal. Ya se ha descrito la capacidad de las partículas virales de atravesar las barreras epiteliales, desde donde pueden diseminarse a otros tejidos y órganos (Górski et al., 2006; Huh et al., 2019; Nguyen et al., 2017). Esto concuerda con los resultados obtenidos, un mayor porcentaje de partículas fágicas detectadas en el líquido ascítico (45% de positivos), que es el fluido que está más en contacto con el sistema intestinal, y un menor porcentaje (14% positivos) en el LCR, que está más alejado y, además, está protegido por las meninges, que le proporcionan una barrera adicional al paso de cualquier agente o sustancia. La presencia de fagos en el LCR ya se ha sugerido mediante el análisis metagenómico del viroma de este fluido, donde se determinó que la mayoría de *contigs* analizados pertenecían a bacteriófagos (Ghose et al., 2019). Respecto a la orina, otro fluido considerado originalmente estéril, la presencia de fagos podría atribuirse a una contaminación procedente de la uretra distal, la vagina o el peritoneo.

Para poder dar un enfoque más profundo de la diversidad fágica se realizó un análisis del viroma de estas muestras. Sin embargo, el limitado número de fagos presentes en algunas de ellas y el complejo procesamiento para obtener exclusivamente el ADN del interior de las cápsidas evitando el ADN no encapsidado, dificultó la recuperación de ADN fágico en la concentración y pureza requerida por la técnica, pudiéndose secuenciar sólo 5 muestras (1 de líquido ascítico y 4 de orina). Los resultados de los viromas de líquido ascítico y orina mostraron una elevada diversidad de fagos, incluyendo aquellos que infectan a diferentes especies de enterobacterias además de a *Staphylococcus*, *Propionibacterium* y fagos tipo *CrAssphage* (que infecta a *Bacteroides*). No obstante, ante la similitud genómica existente entre múltiples fagos, y la limitada disponibilidad de secuencias fágicas en las bases de datos (Hatfull & Hendrix, 2011; Zrelavs et al., 2020), estos resultados han de considerarse como coincidencias con la información disponible. Además, un elevado número de *contigs* en la mayoría de los viromas analizados permaneció sin clasificar, es lo que se denomina “materia oscura viral”, secuencias metagenómicas que provienen de virus pero que no se alinean con ninguna secuencia viral de referencia, lo que también es consecuencia de la baja proporción de secuencias virales disponibles en las bases de datos en comparación con otros grupos microbianos (Cantalupo et al., 2011; Fernández-Orth et al., 2019; Fitzgerald et al., 2021;

Shkoporov & Hill, 2019). El análisis de los viomas de orina y líquido ascítico también reveló un elevado porcentaje de secuencias bacterianas, que además excedían el número de secuencias identificadas como fágicas, observándose una gran diversidad de genes *16S ARNr* pertenecientes a diferentes géneros bacterianos. Dentro de los genes bacterianos se identificaron una gran variedad de GRAs, que proporcionan resistencia a los antibióticos más utilizados en clínica, como los β -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas o aminoglucósidos. Para verificar si los GRAs detectados en los viomas estaban localizados en genomas bacterianos (cromosómico o plasmídico) o en genomas fágicos, se realizó el análisis de las regiones flanqueantes de estos GRAs, revelando que la mayoría se localizaban en genomas bacterianos, lo que sugiere que las partículas fágicas detectadas contenían en su mayoría ADN bacteriano y en pocos casos ADN fágico (Brown-Jaque et al., 2018a; Enault et al., 2017; Fernández-Orth et al., 2019). La presencia de ADN bacteriano en la fracción viral no es un evento inesperado (Cantalupo et al., 2011; Fernández-Orth et al., 2019), ya que podría estar asociado a la presencia de agentes de transferencia génica (Lang et al., 2012) o a eventos de transducción generalizada (Thierauf et al., 2009) o lateral (Chen et al., 2018), donde fragmentos de ADN bacteriano son empaquetados en las cápsides fágicas con una elevada eficiencia, especialmente en la transducción lateral (Humphrey et al., 2021).

Se realizaron controles estrictos para garantizar que todo el ADN analizado en los viomas procedía del interior de las cápsides fágicas, y descartar, así, una contaminación con ADN exógeno durante el proceso de extracción de ADN o la generación de librerías. Se realizó un tratamiento con cloroformo, para romper las posibles vesículas de membrana, y ADNasa para eliminar el ADN libre fuera de las cápsides fágicas. Previa ruptura de cápsides se tomó una alícuota y se verificó la eficacia de la ADNasa mediante la amplificación por qPCR del gen *16S ARNr*, elegido por estar presente en bacterias. Los resultados negativos obtenidos en esta prueba indicaron la ausencia de ADN bacteriano (plasmídico o cromosómico) fuera de las cápsides fágicas y confirmó que el ADN detectado en los viomas correspondía únicamente al localizado dentro de las cápsides fágicas.

En una segunda parte de este estudio se analizó cómo los fagos interfieren con el diagnóstico clínico. En muchas ocasiones, la detección del agente patógeno causante de una infección requiere de un cultivo líquido en medio selectivo para su correcta identificación. Una muestra en la que estén presentes fagos capaces de infectar al patógeno puede llegar a interferir en su correcto aislamiento, debido a que los fagos podrían propagar durante el cultivo, causando la lisis del patógeno que se pretende aislar. En estudios previos se corroboró esta sospecha, aislando *E. coli* en placas de agar inoculadas con muestras de líquido ascítico, que eran imposibles de detectar en cultivo en medio líquido, debido a que la muestra contenía fagos (Brown-Jaque et al., 2016). Por otra parte, la interferencia de las partículas fágicas en la

identificación de patógenos también tiene lugar con las técnicas de detección moleculares, ya que los métodos de extracción de ADN utilizados habitualmente son incapaces de distinguir entre ADN bacteriano y fágico, y dado que los fagos movilizan un elevado número de genes bacterianos, podrían ser identificados erróneamente como bacterias. Para intentar paliar este problema, en este estudio se ha propuesto un método de filtración sencillo, económico y eficaz que reduce las partículas fágicas presentes en las muestras, evitando o reduciendo considerablemente la lisis del huésped, lo que permite la recuperación bacteriana y por tanto un correcto diagnóstico.

La ubicuidad fágica en diferentes órganos y tejidos humanos y animales (Chaffringeon et al., 2021; Dickson & Huffnagle, 2015; Edlund et al., 2015; Foulongne et al., 2012; Guerin & Hill, 2020; Letarov & Kulikov, 2009; Liang & Bushman, 2021), junto con la detección de partículas fágicas que contienen genes bacterianos y GRAs en el tracto intestinal (Fernández-Orth et al., 2019) y diversos fluidos humanos, nos hizo plantearnos que la presencia de dichas partículas portadoras de GRAs era plausible también en órganos animales.

En el Capítulo 3 de la presente tesis se ha evaluado la presencia de partículas fágicas portadoras de GRAs en hígados de pollos, seleccionados porque son uno de los órganos más destacados por su participación en la eliminación de bacterias y virus del organismo (Llorente & Schnabl, 2016; Øie et al., 2020), y además porque ya se ha reportado la presencia de fagos en este órgano (Dąbrowska, 2019; Podlacha et al., 2021). Se detectaron partículas fágicas de diferente morfología capaces de infectar a *E. coli*, aunque esta diversidad fágica podría estar subestimada, ya que se requiere un número elevado de partículas (10^7 - 10^8) para su visualización por microscopía electrónica (Brown-Jaque et al., 2018a), por lo que no se detectarían fagos de otras morfologías presentes en menor número. Dichas partículas contenían todos los GRAs de estudio, siendo los genes con mayor concentración *bla*_{TEM} y *tetW*. Es remarcable que los antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas han sido de los más utilizados habitualmente en la industria avícola de la Unión Europea, y actualmente siguen siendo antibióticos autorizados de primera línea (Roth et al., 2019). El uso de este tipo de antibióticos en pollos ha podido generar una presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas de la microbiota aviar, seleccionando estas resistencias (AbdelRahman et al., 2020; di Francesco et al., 2021; Souza et al., 2020; Xiong et al., 2018).

La presencia de partículas fágicas infecciosas en el hígado, incluidas las portadoras de GRAs, puede atribuirse a su translocación desde otros biomas, en este caso, probablemente desde el microbioma fecal (Górski et al., 2006; Nguyen et al., 2017). La comparativa del viroma hepático con dos viromas fecales de pollo reveló que de un 89% a un 97% de las especies bacterianas y virales encontradas en el hígado, también se encontraban en heces. Esta

elevada coincidencia apoya el origen intestinal de las partículas fágicas detectadas en hígados de pollo, y apunta a la translocación desde el tracto intestinal como la ruta más probable por la que los fagos lleguen al hígado a través de la colonización sistémica. Es necesario destacar que, aunque los hígados y las muestras fecales provienen de la misma granja y tipo de pollo, las muestras se tomaron en diferentes periodos de tiempo, haciendo que esta coincidencia sea aún más relevante.

El hígado, junto con el bazo, es uno de los órganos donde se produce una mayor acumulación de bacteriófagos. Sin embargo, los estudios farmacocinéticos sugieren que, a pesar de que los fagos se acumulan en este órgano, también se inactivan rápidamente, ya que el hígado es el principal responsable de su eliminación (Dąbrowska, 2019; Popescu et al., 2021; van Belleghem et al., 2018), particularmente por los macrófagos encontrados en las células de Kupffer (Inchley, 1969; Kaźmierczak et al., 2021). No obstante, la eficiencia de la eliminación de fagos circulantes y la tolerancia del sistema inmune dependen de muchas variables: el tipo de fagos, el tamaño de los viriones, la cantidad de fagos e incluso el método de administración, si lo hubiera (Dąbrowska, 2019; Podlacha et al., 2021). La mayoría de los estudios sobre la eliminación de fagos por el hígado se han realizado con suspensiones fágicas administradas y no utilizando fagos residentes. También se han descrito en condiciones de laboratorio fagos mutantes que son capaces de eludir la fagocitosis y su degradación (Merril et al., 1996). Si esto ocurre en el laboratorio, también podría suceder con fagos naturales, explicando la presencia de las partículas fágicas en los hígados de pollo analizados.

Es interesante resaltar que tanto en los viomas fecales de pollo como en el de hígado se realizó un análisis de los GRAs, sin embargo, los resultados fueron diferentes a los obtenidos por qPCR. En el viroma obtenido de hígados no se detectaron GRAs. Esto puede deberse a que la qPCR es una técnica mucho más sensible, capaz de detectar hasta una copia genómica, y el límite de detección de la metagenómica no permite detectar niveles tan bajos. En heces de pollo sí se observó una mayor correlación entre los GRAs detectados por qPCR y por metagenómica, posiblemente por la mayor concentración de GRAs en las muestras fecales. En trabajos anteriores se observaron resultados similares, especialmente en muestras complejas, donde los GRAs de los viomas analizados solo coincidían con los que presentaron las concentraciones más elevadas en el análisis por qPCR (Fernández-Orth et al., 2019).

La presencia de fagos y fagos portadores de GRAs en órganos y fluidos humanos y animales puede deberse a su ingestión con la dieta, constituyendo la cadena alimentaria un nexo entre los biomas humanos, animales y el medio ambiente. En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se demostró la presencia de partículas fágicas portadoras de diferentes

GRAs en vegetales, muchos de ellos consumidos habitualmente crudos o poco cocinados (Larrañaga et al., 2018). Al constituir una potencial vía de entrada de cualquier agente microbiológico, en la presente tesis se ha querido profundizar en la importancia de los alimentos como vehículos en la adquisición de partículas fágicas portadoras de genes bacterianos y de GRAs, analizando nuevos grupos de alimentos: carnes, productos lácteos, pescados y mariscos (Capítulos 2, 4 y 5, respectivamente).

En alimentos se utilizan unos criterios microbiológicos para garantizar la seguridad de los productos que consumimos, que además nos proporcionan información sobre si su procesado se ha llevado a cabo bajo unas condiciones higiénicas correctas. A pesar de que prácticamente la totalidad de las muestras analizadas fueron consideradas aptas para su consumo según la normativa vigente (The Commission of the European Communities, 2005), todas mostraron elevadas concentraciones de microorganismos totales resistentes a ampicilina, y en algunas de las muestras (carnes picadas y queso fresco) *E. coli* resistentes a ampicilina. La elevada presencia de bacterias resistentes a antibióticos en matrices cárnicas y pescado de piscifactorías ya ha sido reportada previamente (Costa et al., 2022; García-Béjar et al., 2021; Hamza et al., 2020; Jia et al., 2022). No obstante, en las normativas actuales las bacterias resistentes a antibióticos no están contempladas.

También destaca la detección de colifagos somáticos en prácticamente todos los alimentos analizados. En la industria alimentaria, la utilización de determinados tratamientos antimicrobianos como la cloración, tratamientos térmicos o altas presiones hidrostáticas presentan una menor eficacia en la eliminación de bacteriófagos, incluidos aquellos con GRAs (Calero-Cáceres & Muniesa, 2016). Además, el uso de ciertos aditivos alimentarios como EDTA o citrato sódico, puede inducir el ciclo lítico de algunos profagos presentes en la microbiota de los alimentos (Colomer-Lluch et al., 2014a). Estas condiciones favorecen que los fagos puedan persistir y dispersarse al ambiente o a los propios alimentos, y llegar a la microbiota intestinal por ingestión.

En cuanto a las resistencias, se detectaron GRAs en la fracción fágica de todos los grupos de alimentos analizados, tanto en el análisis de las muestras directas como tras la propagación. En general, los GRAs con un mayor porcentaje de positivos fueron aquellos que proporcionan resistencia a β -lactámicos, donde destaca *bla*_{TEM} como el más prevalente. La elevada prevalencia de β -lactamasas en alimentos podría estar relacionada con su uso veterinario (de Briyne et al., 2014) y por la elevada presencia de enterobacterias productoras de BLEA en los mismos y en heces de origen animal (Alegría et al., 2020; Mesa et al., 2006; Tekiner & Özpınar, 2016; Ye et al., 2018), que podrían contaminar los alimentos. También destaca el gen *sul1*, cuya prevalencia en muestras cárnicas y productos lácteos podría estar relacionada con el

amplio uso de sulfonamidas en veterinaria (Kools et al., 2008). El gen *tetW* fue uno de los más prevalentes en pescados y mariscos, reflejando el amplio uso de tetraciclinas en acuicultura y su dispersión en diversos ambientes (Pereira et al., 2015; Tamminen et al., 2011).

Tras los experimentos de propagación, a pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos, se observó un incremento en el número de positivos para algunos GRAs, y muchos de los que fueron indetectables en las muestras directas, se detectaron tras la propagación, lo que evidencia que parte de las partículas fágicas portadoras de GRAs eran infecciosas y por tanto capaces de propagar sobre la cepa de *E. coli* WG5. Sin embargo, no hay explicación clara para los distintos niveles de propagación observados entre las muestras. Podría ser que algunos GRAs puedan ser más propensos a ser empaquetados por mecanismos de transducción especializada, tal vez debido a su ubicación aguas abajo de un profago, mientras que otros GRAs podrían ubicarse en distintas partes del cromosoma bacteriano, lo que motivaría su movilización por mecanismos de transducción generalizada o lateral. También es posible que, dado que analizamos *pools* de fagos extraídos de las muestras, ambos tipos de partículas coexistieran, dando lugar a niveles de propagación diferentes según la composición del *pool* de fagos. En otros casos no se observó propagación en absoluto, lo que puede ser debido a que la cepa *E. coli* WG5 no era un huésped adecuado, a que las partículas fágicas estaban dañadas, o a que los GRAs estaban dentro de partículas transductantes incapaces de propagar (Chen et al., 2018; Thierauf et al., 2009).

Se ha descrito que la mayoría de los bacteriófagos, entendidos como cápsides de fagos que contienen genomas fágicos completos, en pocas ocasiones contienen GRAs (Enault et al., 2017). Esto concuerda con los resultados de nuestros estudios, donde la mayor parte de las partículas fágicas detectadas serían partículas transductantes que solo contienen ADN bacteriano. Estas partículas transductantes no se consideran al analizar viomas y tienden a confundirse con una contaminación por ADN bacteriano. No obstante, el riguroso protocolo realizado en nuestros estudios para descartar una contaminación con ADN bacteriano exógeno (fuera de las cápsides fágicas) prácticamente elimina esta posibilidad, por lo que todo el ADN analizado en los alimentos se considera que está dentro de las cápsides fágicas.

La capacidad fágica de transmitir GRAs a una cepa receptora a través de eventos de transducción generalizada en alimentos se ha visto en un estudio realizado en carne de pollo (Shousha et al., 2015). Sin embargo, los numerosos intentos para transducir algunos de los GRAs en nuestros estudios no tuvieron éxito. Esto puede ser debido a diversos factores: que la cepa huésped receptora no fuera susceptible a los fagos en las muestras o que de serlo no poseyera el sitio adecuado que permitiera la recombinación de estos GRAs; que la frecuencia de la transducción fuera demasiado baja para ser detectada; o que otros fagos virulentos en

las muestras propagaran y mataran las células transducentes antes de que fueran aisladas. Es necesario destacar que se escogió a la cepa *E. coli* WG5 para realizar los experimentos de propagación debido a que es muy sensible para la detección de fagos de origen fecal, algunos de los cuales podrían albergar GRAs. Además, su genoma no contiene profagos ni ningún GRA de los analizados en estos estudios (Imamovic et al., 2018), lo que garantiza que las partículas fágicas portadoras de GRAs detectadas después de la propagación tienen su origen en las propias muestras. No obstante, *E. coli* WG5 no es necesariamente el mejor huésped para la propagación de fagos a partir de algunas muestras, como en el caso de lácteos o pescados y mariscos, donde el uso de bacterias ácido-lácticas o de bacterias marinas, respectivamente, probablemente serían mejores huéspedes. En cambio, en productos cárnicos, donde se detectaron los niveles más elevados de indicadores fecales, se observó un mayor incremento de positivos para GRAs tras la propagación, y en este caso *E. coli* WG5 sí que fue un huésped apropiado.

El origen de las partículas fágicas (incluidas las portadoras de GRAs) en alimentos puede ser muy diverso, desde la propia materia prima a una contaminación externa. Como se ha comentado, las matrices cárnicas fueron los alimentos que presentaron los niveles más elevados de indicadores fecales, especialmente las carnes de pollo, hecho que sumado a la presencia de partículas fágicas portadoras de GRAs en heces de pollo, hacen plausible un origen fecal de las partículas fágicas con GRAs detectadas en carnes. Esta contaminación podría atribuirse a las condiciones de reproducción y cría de los pollos y al deficiente procesamiento y manejo de la carne antes de venderla (Sousa, 2008), siendo esencial unas buenas prácticas de higiene durante la elaboración de los productos y un correcto cocinado de estos alimentos (Luber, 2009).

En el caso de productos lácteos y horchata, el origen de las partículas fágicas podría ser la propia materia prima (leche cruda o chufa en el caso de la horchata) (Madera et al., 2004; Quigley et al., 2013) o incluso las cepas utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de algunos de los productos (Chopin et al., 2001). Además, los fagos son capaces de eludir las barreras anatómicas y fisiológicas del animal productor (Dinleyici et al., 2021; Huh et al., 2019) y también pueden ser inducidos a partir de la propia microbiota láctea (Garneau & Moineau, 2011). Independientemente de su origen, es destacable que algunos fagos infecciosos pueden persistir en la leche incluso después del proceso de pasteurización (Atamer et al., 2013).

La presencia de las partículas fágicas portadoras de GRAs en el caso de productos piscícolas y mariscos podría estar relacionada con una posible contaminación debido a unas pobres condiciones higiénicas durante la captura, el transporte, o incluso durante la etapa de

procesamiento de algunos pescados y mariscos (Novoslavskij et al., 2016), donde se ha visto que unas condiciones higiénicas deficientes pueden incentivar la presencia de potenciales bacterias patógenas en el producto final (Møretrø et al., 2016). Una de las principales fuentes de las partículas fágicas portadoras de GRAs en estas muestras también podría ser el propio hábitat acuático, ya que la constante emisión de residuos a estos ambientes derivados de la actividad humana, especialmente en zonas costeras marinas, puede acabar afectando a estos ecosistemas y a la microbiota de sus habitantes (Nogales et al., 2011; Novoslavskij et al., 2016; Salama et al., 2021).

La influencia del impacto antropogénico en la prevalencia de fagos portadores de GRAs en ecosistemas marinos también ha sido objeto de estudio en esta tesis, llevando a cabo un análisis comparativo de GRAs en la fracción de ADN fágico de muestras de agua de mar de la costa mediterránea, una zona con alto impacto antropogénico, y de agua de mar de la Antártida, una zona prístina (Capítulo 5).

A pesar de que la prevalencia de GRAs en la fracción fágica obtenida de aguas mediterráneas no fue muy alta, es destacable que los GRAs detectados presentaron concentraciones medias elevadas (10^5 - 10^7 CG/L de agua). Estos resultados concuerdan con los de un estudio reciente en viromas marinos del Océano Índico (Calero-Cáceres & Balcázar, 2019), que al igual que el mar Mediterráneo está bajo un alto impacto antropogénico, donde se reportó una baja prevalencia de GRAs aunque con una alta concentración de ciertos genes, especialmente aquellos que confieren resistencia a β -lactámicos y tetraciclinas. Estos hallazgos indican que la presión selectiva generada por los humanos en entornos naturales propicia una mayor abundancia de GRAs movilizados por partículas fágicas.

En el caso de la Antártida, se detectaron todos los GRAs analizados en la fracción fágica, aunque en menor cantidad que en aguas mediterráneas. La menor abundancia de GRAs en aguas antárticas coincide con un estudio en sedimentos de regiones polares donde se observó que a pesar de la prevalencia de algunos GRAs, su concentración fue relativamente baja en comparación con regiones más influenciadas por la actividad humana (Tan et al., 2018). La creciente actividad antropogénica en el área antártica, incluidas las expediciones científicas, las estaciones militares y el turismo, podrían ser responsables de la diseminación de las resistencias a los antibióticos de origen humano en estas regiones (Miller et al., 2009; Segawa et al., 2013; Tin et al., 2009; Wang et al., 2016) y en consecuencia, la presencia de GRAs podría ser resultado de una contaminación por la actividad humana reciente (Hwengwere et al., 2022; Jara et al., 2020; Segawa et al., 2013; Tan et al., 2018). No obstante, la coincidencia de los GRAs detectados tanto en aguas mediterráneas como antárticas, incluso resistencias a antibióticos usados en clínica, corroboran que la resistencia a

antibióticos es un fenómeno natural que precede a la humanidad, siendo detectable incluso en ecosistemas con baja presencia de antibióticos. Esto también se confirma por la detección de GRAs en poblaciones bacterianas aisladas de sedimentos de permafrost (D'Costa et al., 2011) o en muestras de suelo extraídas de regiones antárticas (van Goethem et al., 2018; Wei et al., 2015).

Si bien la mayor abundancia de fagos portadores de GRAs en las aguas mediterráneas es claramente debida al mayor impacto antropogénico, surgen dudas de cuál es su origen en la Antártida. La detección de partículas fágicas portadoras de GRAs tras inducir lisógenos de las comunidades bacterianas antárticas señala a estas poblaciones lisógenas como su posible origen. Se ha descrito que los fagos atemperados están ampliamente distribuidos en las comunidades bacterianas antárticas y priorizan la lisogenia cuando la concentración bacteriana es baja (Brum et al., 2016).

En la presente tesis, la mayoría de las muestras analizadas tienen en común el factor humano, donde todas las actividades derivadas de su acción como la producción intensiva de alimentos y su comercialización a nivel global, los viajes internacionales, el incremento de la densidad poblacional y su urbanización, las deficientes condiciones higiénicas y sanitarias existentes en muchos países y la emisión de residuos de antibióticos al ambiente, sumado al uso excesivo de antibióticos en humanos y animales (ganadería, acuicultura, mascotas), ha hecho posible la distribución global de bacterias resistentes y ha ejercido una presión selectiva que ha propiciado la movilidad de GRAs entre los diferentes ecosistemas (Aslam et al., 2021; Jadeja & Worrich, 2022).

Desde la perspectiva *One-Health*, se aboga por una salud que engloba humanos, animales y al propio ambiente, y se intenta afrontar la problemática actual de las resistencias a antibióticos desde diferentes disciplinas. Para ello, el primer paso es conocer los factores y las vías de transmisión y adquisición de resistencias. Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan nuevas evidencias que pueden contribuir a diseñar estrategias para el control y la reducción de la movilidad de resistencias.

En resumen, de los resultados obtenidos puede concluirse que los seres humanos, los animales, el medio ambiente y la cadena alimentaria constituyen diferentes biomas interconectados mediante una vía circular de entrada y salida de partículas fágicas y de GRAs, siguiendo la ruta vehicular oral-fecal-ambiente-oral (Fig.11). A través de la dieta, las partículas fágicas pueden entrar en organismos humanos y animales e incrementar el número y diversidad de partículas fágicas portadoras de GRAs en el tracto intestinal, desde donde podrían llegar a diseminar a otros órganos humanos y animales y transducir su material genético al entrar en contacto con algún huésped sensible. Además, las partículas fágicas que

contienen GRAs podrían pasar al ambiente a través de los desechos humanos y animales, contaminando estos biomas y cerrando este círculo. La persistencia de las partículas fágicas permite la transferencia de GRAs incluso cuando la bacteria donadora y receptora están separadas, y la existencia de fagos polivalentes, que presentan un espectro de huéspedes amplio, propiciaría que la transducción también pueda tener lugar entre diferentes especies o géneros bacterianos (Fong et al., 2021). Los fagos actuarían, así, como mensajeros entre las diversas comunidades bacterianas, que los utilizarían para dispersar su propio material genético. Por otra parte, la tasa de transducción de GRAs en biomas humanos, animales y ambientales, así como en los alimentos, podría promoverse por la constante presión selectiva ejercida por los residuos de antibióticos en estos ambientes (Ben et al., 2019; Kyuchukova, 2020).

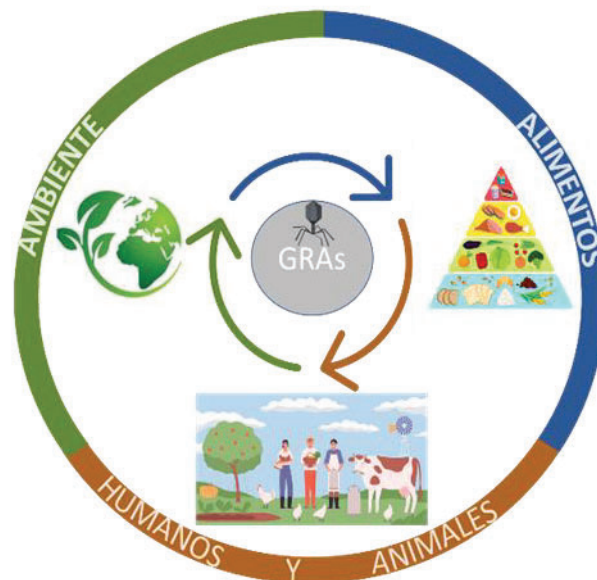


Figura 11. Ruta vehicular oral (alimentos)-fecal (heces animales y humanos)-ambiente-oral

Es importante destacar que la detección de fagos, incluidos los portadores de GRAs, no está contemplada en las prácticas de seguridad alimentaria. No existe una legislación para controlar la propagación de las resistencias a los antibióticos, los GRAs o los elementos genéticos que los movilizan ni en alimentos ni en el medio ambiente. Ante los resultados obtenidos, sería necesaria la identificación y monitoreo de las partículas fágicas portadoras de GRAs para evaluar si pueden constituir un riesgo para la salud humana y su contribución a la emergencia global de las resistencias a antibióticos.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en la presente tesis son:

- Existen partículas fágicas infecciosas en diferentes fluidos humanos. Las muestras de líquido ascítico presentaron el mayor porcentaje de fagos, lo que sugiere que ha tenido que ocurrir algún proceso de translocación desde el tracto intestinal.
- Se detectó una elevada diversidad de genes bacterianos (*16S ARNr*) y de GRAs en la fracción fágica de los fluidos humanos, que puede estar asociada a la capacidad que tienen los fagos de movilizar genes bacterianos mediante la transducción.
- La eficacia de los rigurosos controles realizados en la obtención del ADN del interior de las cápsidas fágicas descarta una contaminación con ADN no encapsidado.
- La presencia de partículas fágicas infecciosas y portadoras de genes bacterianos en muestras clínicas humanas pueden interferir en el correcto diagnóstico microbiológico. Mediante un método de filtración sencillo, económico y eficaz se pueden reducir las partículas fágicas presentes en las muestras, permitiendo la recuperación bacteriana y el correcto diagnóstico.
- Los hígados de pollo contienen partículas fágicas portadoras de GRAs, destacando como uno de los más prevalentes y abundantes el gen *bla_{TEM}*. La coincidencia de especies entre los viomas hepáticos y fecales de pollo sugieren un origen intestinal de las partículas fágicas detectadas en hígados, siendo la translocación desde el tracto intestinal la ruta más probable por la que los fagos llegan al hígado, donde podrían propagar y transducir su material genético (incluidos GRAs), originando un nuevo reservorio de resistencias a antibióticos.
- La qPCR es una técnica mucho más sensible para la detección de GRAs que las herramientas metagenómicas, al detectar genes que se encuentran en concentraciones bajas.
- Diversos grupos de alimentos contienen partículas fágicas infecciosas portadoras de GRAs, siendo el más prevalente el gen *bla_{TEM}*. Si se descarta la contaminación por la manipulación de los alimentos, el origen más probable de las partículas fágicas con GRAs detectadas en carnes es la microbiota intestinal animal. En productos lácteos el origen se atribuye a la materia prima o a los cultivos iniciadores. En pescados el origen más probable es el medio acuático.
- Los ambientes marinos tanto con bajo como con alto impacto antropogénico pueden actuar como reservorios de GRAs. El efecto de la actividad humana causa una mayor selección de GRAs en ambientes marinos como el Mediterráneo, aumentando su abundancia. Sin embargo, se observa una elevada diversidad de resistencias a antibióticos en ambientes marinos con una baja presión antibiótica como la Antártida. El origen de las partículas fágicas portadoras de GRAs en la Antártida, en ausencia de

contaminación humana, podrían ser los lisógenos presentes en las comunidades bacterianas antárticas.

- Los fagos son potenciales vectores de transferencia horizontal de GRAs entre los biomas humanos, animales, ambientales y alimentos, siguiendo la ruta vehicular oral-fecal-ambiente-oral. A través de la dieta, las partículas fágicas portadoras de GRAs pueden entrar en organismos humanos y animales y alcanzar el tracto intestinal, desde donde pueden llegar a diseminar a otros órganos y transducir su material genético a un huésped sensible.
- En ausencia de normativas en materia de seguridad alimentaria y ambiental que controlen los GRAs o los elementos genéticos que los movilizan, sería necesario controlar y evaluar si las partículas fágicas portadoras de GRAs pueden constituir un riesgo para la salud humana y su contribución a la problemática global de las resistencias a antibióticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhamid, M. K., Quijada, N. M., Dzieciol, M., Hatfaludi, T., Bilic, I., Selberherr, E., Liebhart, D., Hess, C., Hess, M., & Paudel, S. (2020). Co-infection of Chicken Layers With *Histomonas meleagridis* and Avian Pathogenic *Escherichia coli* Is Associated With Dysbiosis, Cecal Colonization and Translocation of the Bacteria From the Gut Lumen. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586437>
- AbdelRahman, M. A. A., Roshdy, H., Samir, A. H., & Hamed, E. A. (2020). Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* isolates from imported 1-day-old chicks, ducklings, and turkey poults. *Veterinary World*, *13*(6), 1037–1044. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1037-1044>
- Abushaheen, M. A., Muzaaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, *66*(6). <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Ács, N., Gambino, M., & Brøndsted, L. (2020). Bacteriophage Enumeration and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.594868>
- Alegría, Á., Arias-Temprano, M., Fernández-Natal, I., Rodríguez-Calleja, J. M., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2020). Molecular diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* from foods of animal origin and human patients. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041312>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Alperovitch-Lavy, A., Sharon, I., Rohwer, F., Aro, E. M., Glaser, F., Milo, R., Nelson, N., & Béjà, O. (2011). Reconstructing a puzzle: Existence of cyanophages containing both photosystem-I and photosystem-II gene suites inferred from oceanic metagenomic datasets. *Environmental Microbiology*, *13*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02304.x>
- Anand, T., Bera, B. C., Vaid, R. K., Barua, S., Riyesh, T., Virmani, N., Hussain, M., Singh, R. K., & Tripathi, B. N. (2016). Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *Journal of General Virology*, *97*(12), 3458–3466. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000639>
- Anderson, C. L., Sullivan, M. B., & Fernando, S. C. (2017). Dietary energy drives the dynamic response of bovine rumen viral communities. *Microbiome*, *5*(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0374-3>
- Angly, F. E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R. A., Carlson, C., Chan, A. M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahaffy, J. M., Mueller, J. E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk,

- S., Suttle, C. A., & Rohwer, F. (2006). The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology*, 4(11), 2121–2131. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040368>
- Aogáin, M. mac, Lau, K. J. X., Cai, Z., Narayana, J. K., Purbojati, R. W., Drautz-Moses, D. I., Gaultier, N. E., Jaggi, T. K., Tiew, P. Y., Ong, T. H., Koh, M. S., Hou, A. L. Y., Abisheganaden, J. A., Tsaneva-Atanasova, K., Schuster, S. C., & Chotirmall, S. H. (2020). Metagenomics reveals a core macrolide resistome related to microbiota in chronic respiratory disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 202(3), 433–447. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2202OC>
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Atamer, Z., Meike, S., Neve, H., Heller, K. J., & Hinrichs, J. (2013). Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00191>
- Awad, W. A., Dublec, F., Hess, C., Dublec, K., Khayal, B., Aschenbach, J. R., & Hess, M. (2016). *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. *Poultry Science*, 95(10), 2259–2265. <https://doi.org/10.3382/ps/pew151>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Baker, S., Hardy, J., Sanderson, K. E., Quail, M., Goodhead, I., Kingsley, R. A., Parkhill, J., Stocker, B., & Dougan, G. (2007). A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella Typhi*. *PLoS Pathogens*, 3(5), 0605–0610. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030059>
- Balasubramanian, S., Osburne, M. S., BrinJones, H., Tai, A. K., & Leong, J. M. (2019). Prophage induction, but not production of phage particles, is required for lethal disease in a microbiome-replete murine model of enterohemorrhagic *E. coli* infection. *PLoS Pathogens*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007494>
- Balcázar, J. L. (2014). Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. *PLoS Pathogens*, 10(7), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219>
- Balcázar, J. L. (2020). Implications of bacteriophages on the acquisition and spread of antibiotic resistance in the environment. *International Microbiology*, 23(4), 475–479. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00121-5>

- Balero de Paula, S., Cayô, R., Streling, A. P., Silva Nodari, C., Pereira Matos, A., Eches Perugini, M. R., Gales, A. C., Carrara-Marroni, F. E., & Yamada-Ogatta, S. F. (2017). Detection of *bla*_{VIM-7} in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *89*(1), 80–82.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.008>
- Bárdy, P., Füzik, T., Hrebík, D., Pantůček, R., Thomas Beatty, J., & Plevka, P. (2020). Structure and mechanism of DNA delivery of a gene transfer agent. *Nature Communications*, *11*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16669-9>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, *315*, 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, *169*, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Bengtsson, B., & Greko, C. (2014). Antibiotic resistance—consequences for animal health, welfare, and food production. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 96–102.
<https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901445>
- Bergogne-Bérézin, E. (1997). Who or what is the source of antibiotic resistance? *Journal of Medical Microbiology*, *46*(6), 461–470. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379476>
- Bi, L., Yu, D. T., Han, L. L., Du, S., Yuan, C. Y., He, J. Z., & Hu, H. W. (2022). Unravelling the ecological complexity of soil viromes: Challenges and opportunities. *Science of the Total Environment*, *812*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152217>
- Billard-Pomares, T., Fouteau, S., Jacquet, M. E., Roche, D., Barbe, V., Castellanos, M., Bouet, J. Y., Cruveiller, S., Médigue, C., Blanco, J., Clermont, O., Denamur, E., & Branger, C. (2014). Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(11), 6550–6557.
<https://doi.org/10.1128/AAC.03183-14>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42–51.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2020). Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean seawater ecosystems. *Microorganisms*, *8*(9), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091293>

- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F. (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*, 66(8), 1290–1297. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J. J., Cornejo, T., Hurtado, J. C., Navarro, F., & Muniesa, M. (2018a). Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 79, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., & Navarro, F. (2016). Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Scientific Reports*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep33000>
- Brown-Jaque, M., Rodríguez Oyarzun, L., Cornejo-Sánchez, T., Martín-Gómez, M. T., Gartner, S., de Gracia, J., Rovira, S., Alvarez, A., Jofre, J., González-López, J. J., & Muniesa, M. (2018b). Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00856>
- Brum, J. R., Hurwitz, B. L., Schofield, O., Ducklow, H. W., & Sullivan, M. B. (2016). Seasonal time bombs: Dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *ISME Journal*, 10(2), 437–449. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.125>
- Brum, J. R., Schenck, R. O., & Sullivan, M. B. (2013). Global morphological analysis of marine viruses shows minimal regional variation and dominance of non-tailed viruses. *ISME Journal*, 7(9), 1738–1751. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.67>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Calero-Cáceres, W., & Balcázar, J. L. (2019). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats. *Science of the Total Environment*, 654, 452–455. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.166>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental Science and Technology*, 48(13), 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>

- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>
- Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*, 95, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>
- Camarillo-Guerrero, L. F., Almeida, A., Rangel-Pineros, G., Finn, R. D., & Lawley, T. D. (2021). Massive expansion of human gut bacteriophage diversity. *Cell*, 184(4), 1098-1109.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.029>
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews*, 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., Grabe, M., Hendrix, R. W., Girones, R., Wang, D., & Pipas, J. M. (2011). Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio*, 2(5), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>
- Carr, V. R., Shkoporov, A., Hill, C., Mullany, P., & Moyes, D. L. (2021). Probing the Mobilome: Discoveries in the Dynamic Microbiome. *Trends in Microbiology*, 29(2), 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.003>
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Castanon, J. I. R. (2007). History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, 86(11), 2466–2471. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
- Castillo, D., Kauffman, K., Hussain, F., Kalatzis, P., Rørbo, N., Polz, M. F., & Middelboe, M. (2018). Widespread distribution of prophage-encoded virulence factors in marine *Vibrio* communities. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28326-9>
- Cesur, S., & Demiröz, A. P. (2013). Antibiotics and the Mechanisms of Resistance to Antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 21(4), 138–142. <https://doi.org/10.12816/0002645>
- Chaffringeon, L., Lamy-Besnier, Q., Debarbieux, L., & de Sordi, L. (2021). The intestinal virome: lessons from animal models. *Current Opinion in Virology*, 51, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.09.016>
- Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., & Shuman, H. A. (2011). Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1114–1121. <https://doi.org/10.1128/JB.01146-10>

- Chase, A. B., Weihe, C., & Martiny, J. B. H. (2021). Adaptive differentiation and rapid evolution of a soil bacterium along a climate gradient. *PNAS*, *118*(18), 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101254118/-/DCSupplemental>
- Che, Y., Xia, Y., Liu, L., Li, A. D., Yang, Y., & Zhang, T. (2019). Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. *Microbiome*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0663-0>
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y. N., Bacigalupe, R., Filloi-Salom, A., Chee, M. S. J., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2018). Genome hypermobility by lateral transduction. *Science*, *362*(6411), 207–212. <https://doi.org/10.1126/science.aat5867>
- Chen, M.-L., An, X.-L., Liao, H., Yang, K., Su, J.-Q., & Zhu, Y.-G. (2021). Viral Community and Virus-Associated Antibiotic Resistance Genes in Soils Amended with Organic Fertilizers. *Environmental Science & Technology*, *55*(20), 13881–13890. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03847>
- Chen, Y., Guo, J., Shi, D., Fang, D., Chen, C., & Li, L. (2018). Ascitic Bacterial Composition Is Associated With Clinical Outcomes in Cirrhotic Patients With Culture-Negative and Non-neutrocytic Ascites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00420>
- Chen, Y. M., Holmes, E. C., Chen, X., Tian, J. H., Lin, X. D., Qin, X. C., Gao, W. H., Liu, J., Wu, Z. D., & Zhang, Y. Z. (2020). Diverse and abundant resistome in terrestrial and aquatic vertebrates revealed by transcriptional analysis. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75904-x>
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, *15*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Chibani, C. M., Farr, A., Klama, S., Dietrich, S., & Liesegang, H. (2019). Classifying the unclassified: A phage classification method. *Viruses*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/v11020195>
- Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Chopin, M., Microbienne, G., Vilvert, D. de, & Cedex, J. (2001). Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Research*, *29*(3), 644–651.
- Clokier, M., Millard, A., Letarov, A., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Cobo-Díaz, J. F., Alvarez-Molina, A., Alexa, E. A., Walsh, C. J., Mencía-Ares, O., Puente-Gómez, P., Likotrafiti, E., Fernández-Gómez, P., Prieto, B., Crispie, F., Ruiz, L., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., Cotter, P., & Alvarez-Ordóñez, A. (2021). Microbial colonization and resistome dynamics in food processing environments of a newly opened pork cutting industry during 1.5 years of activity. *Microbiome*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01131-9>

- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., & Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the *Enterobacteriaceae* Family – A Review. *Frontiers in Microbiology*, 8(June), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., & Mora, D. (2016). Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), 1–5. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw003>
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014b). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011b). Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011a). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE*, 6(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014a). Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1265–1274.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- Coque, T. M., Baquero, F., & Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance*, 13(47), 1–11.
<https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en>
- Cortés, P., Spricigo, D. A., Bardina, C., & Llagostera, M. (2015). Remarkable diversity of *Salmonella* bacteriophages in swine and poultry. *FEMS Microbiology Letters*, 362(2).
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnu034>
- Costa, M. M., Cardo, M., Soares, P., D'anjo, M. C., & Leite, A. (2022). Multi-Drug and β -Lactam Resistance in *Escherichia coli* and Food-Borne Pathogens from Animals and Food in Portugal, 2014–2019. *Antibiotics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010090>
- Coutinho, F. H., Pinto, L. H., Vieira, R. P., Martins, O. B., Salloto, G. R. B., Santoro, D. de O., Clementino, M. M., & Cardoso, A. M. (2013). Antibiotic Resistance in Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. In *Perspectives in Water Pollution* (pp. 1–22). InTech.
<https://doi.org/10.5772/54638>

- Cuadrat, R. R. C., Sorokina, M., Andrade, B. G., Goris, T., & Dávila, A. M. R. (2020). Global ocean resistome revealed: Exploring antibiotic resistance gene abundance and distribution in TARA Oceans samples. *GigaScience*, 9(5), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa046>
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., & Bürgmann, H. (2015). Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environment International*, 81, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>
- Dąbrowska, K. (2019). Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 2000–2025. <https://doi.org/10.1002/med.21572>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- de Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S. P., & Pokludová, L. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*, 175(13), 325. <https://doi.org/10.1136/vr.102462>
- de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in Microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006>
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Roux, F. le, Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., & Voituren, Y. (2018). The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(14), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>
- di Francesco, A., Salvatore, D., Sakhria, S., Catelli, E., Lupini, C., Abbassi, M. S., Bessoussa, G., ben Yahia, S., & ben Chehida, N. (2021). High frequency and diversity of tetracycline resistance genes in the microbiota of broiler chickens in Tunisia. *Animals*, 11(2), 1–7. <https://doi.org/10.3390/ani11020377>
- Dickson, R. P., & Huffnagle, G. B. (2015). The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004923>
- Dinleyici, M., Pérez-Brocal, V., Arslanoglu, S., Aydemir, O., Sevuk Ozumut, S., Tekin, N., Vandenplas, Y., Moya, A., & Dinleyici, E. C. (2021). Human milk virome analysis: Changing pattern regarding mode of delivery, birth weight, and lactational stage. *Nutrients*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/nu13061779>
- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews*, 18(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>

- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews*, 2(5), 414–424. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>
- Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E., Dibdakova, K., Maceckova, G., Kohoutova, L., Literak, I., Smola, J., & Cizek, A. (2011). Plasmids carrying *bla_{CTX-M-1}* and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 757–764. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq500>
- Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012a). Integrons Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2(5), 211–223. <https://doi.org/10.4161/mge.22967>
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W. F., Johnsen, P. J., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012b). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Pathogens*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002837>
- Dubey, G., & Ben-Yehuda, S. (2011). Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144(4), 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.015>
- Dupuis, M. È., Villion, M., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2013). CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms3087>
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G. Z., Boling, L., Barr, J. J., Speth, D. R., Seguritan, V., Aziz, R. K., Felts, B., Dinsdale, E. A., Mokili, J. L., & Edwards, R. A. (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- Edlund, A., Santiago-Rodriguez, T. M., Boehm, T. K., & Pride, D. T. (2015). Bacteriophage and their potential roles in the human oral cavity. *Journal of Oral Microbiology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.3402/jom.v7.27423>
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., & Sullivan, M. B. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME Journal*, 11(1), 237–247. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.90>
- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Ezzat, A., Noor, M., Isa, M., Sapian, I. S., Kamel, Z., Elhady, A., Elwahab, A., & Hamed, E. (2014). Metagenomic Study of the Liver Microbiota in Liver Cancer-Metagenomic and

- Metatranscriptomic Analyses of the Hepatocellular Carcinoma- Associated Microbial Communities and the Potential Role of Microbial Communities in Liver Cancer. *Journal of Gastrointestinal & Digestive System*, 4(5). <https://doi.org/10.4172/2161-069X.1000228>
- Fancello, L., Desnues, C., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2011). Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(August), 2448–2454. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr315>
- Fang, Y., Mercer, R. G., McMullen, L. M., & Gänzle, M. G. (2017). Induction of Shiga Toxin-Encoding Prophage by Abiotic Environmental Stress in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), e01378-17. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews*, 13(10), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Fernández-Orth, D., Miró, E., Brown-Jaque, M., Rodríguez-Rubio, L., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., González-López, J. J., Muniesa, M., & Navarro, F. (2019). Faecal phageome of healthy individuals: presence of antibiotic resistance genes and variations caused by ciprofloxacin treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), 854–864. <https://doi.org/10.1093/jac/dky540>
- Ficht, T. A. (2011). Bacterial exchange via nanotubes: Lessons learned from the history of molecular biology. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00179>
- Fillol-Salom, A., Bacigalupe, R., Humphrey, S., Chiang, Y. N., Chen, J., & Penadés, J. R. (2021). Lateral transduction is inherent to the life cycle of the archetypical *Salmonella* phage P22. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26520-4>
- Firleyanti, A. S., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2016). Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.026>
- Fitzgerald, C. B., Shkoporov, A. N., Upadrasta, A., Khokhlova, E. v., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). Probing the “Dark Matter” of the Human Gut Phageome: Culture Assisted Metagenomics Enables Rapid Discovery and Host-Linking for Novel Bacteriophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.616918>
- Fong, K., Wong, C. W. Y., Wang, S., & Delaquis, P. (2021). How Broad Is Enough: The Host Range of Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector. *PHAGE: Therapy, Applications and Research*, 2(2), 83–91. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0036>
- Forsberg, K. J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E. M., Sommer, M. O. A., & Dantas, G. (2012). The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337(6098), 1107–1111. <https://doi.org/10.1126/science.1220761>

- Fortier, L. C., & Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), 354–365. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>
- Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M. A., Pariente, K., Segondy, M., Burguière, A., Manuguerra, J. C., Caro, V., & Eloit, M. (2012). Human skin Microbiota: High diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS ONE*, 7(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038499>
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews*, 3(9), 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Fuhrman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399(6736), 541–548. <https://doi.org/10.1038/21119>
- Fujiya, Y., Harada, T., Sugawara, Y., Akeda, Y., Yasuda, M., Masumi, A., Hayashi, J., Tanimura, N., Tsujimoto, Y., Shibata, W., Yamaguchi, T., Kawahara, R., Nishi, I., Hamada, S., Tomono, K., & Kakeya, H. (2021). Transmission dynamics of a linear *vanA*-plasmid during a nosocomial multiclonal outbreak of vancomycin-resistant *enterococci* in a non-endemic area, Japan. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94213-5>
- Gabashvili, E., Osepashvili, M., Koulouris, S., Ujmajuridze, L., Tskhitishvili, Z., & Kotetishvili, M. (2020). Phage Transduction is Involved in the Intergeneric Spread of Antibiotic Resistance-Associated *bla*_{CTX-M}, *mel*, and *tetM* Loci in Natural Populations of Some Human and Animal Bacterial Pathogens. *Current Microbiology*, 77(2), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01817-2>
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2565–2571. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003>
- Galimand, M., Sabtcheva, S., & Lambert, T. (2005). Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *American Society for Microbiology*, 49(7), 2949–2953. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2949-2953.2005>
- Ganjian, H., Nikokar, I., Tieshayar, A., Mostafaei, A., Amirmozafari, N., & Kiani, S. (2012). Effects of salt stress on the antimicrobial drug resistance and protein profile of *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(1), 328–331. <https://doi.org/10.5812/kowsar.20083645.2375>
- García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands

- and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, *307*, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>
- García-Aljaro, C., Ballesté, E., & Muniesa, M. (2017). Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, *38*, 95–105.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.011>
- García-Béjar, B., García de Blas Martín, I., Arévalo-Villena, M., & Briones Pérez, A. (2021). High Prevalence of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Retail Poultry Products in Spain. *Animals*, *11*, 3197. <https://doi.org/10.3390/ani11113197>
- García-Galán, M. J., Silvia Díaz-Cruz, M., & Barceló, D. (2009). Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. *Trends in Analytical Chemistry*, *28*(6), 804–819. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.006>
- Garin-Fernandez, A., Pereira-Flores, E., Glöckner, F. O., & Wichels, A. (2018). The North Sea goes viral: Occurrence and distribution of North Sea bacteriophages. *Marine Genomics*, *41*, 31–41.
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.05.004>
- Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Garner, E., Chen, C., Xia, K., Bowers, J., Engelthaler, D. M., McLain, J., Edwards, M. A., & Pruden, A. (2018). Metagenomic Characterization of Antibiotic Resistance Genes in Full-Scale Reclaimed Water Distribution Systems and Corresponding Potable Systems. *Environmental Science and Technology*, *52*(11), 6113–6125. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05419>
- Garriss, G., & Henriques-Normark, B. (2020). Lysogeny in *Streptococcus pneumoniae*. *Microorganisms*, *8*(10), 1546. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101546>
- Ghose, C., Ly, M., Schwanemann, L. K., Shin, J. H., Atab, K., Barr, J. J., Little, M., Schooley, R. T., Chopyk, J., & Pride, D. T. (2019). The Virome of Cerebrospinal Fluid: Viruses Where We Once Thought There Were None. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02061>
- Gilbert, R. A., Townsend, E. M., Crew, K. S., Hitch, T. C. A., Friedersdorff, J. C. A., Creevey, C. J., Pope, P. B., Ouwerkerk, D., & Jameson, E. (2020). Rumen Virus Populations: Technological Advances Enhancing Current Understanding. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1–26.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00450>
- Gilroy, R., Ravi, A., Getino, M., Pursley, I., Horton, D. L., Alikhan, N.-F., Baker, D., Gharbi, K., Hall, N., Watson, M., Adriaenssens, E. M., Foster-Nyarko, E., Jarju, S., Secka, A., Antonio, M., Oren, A., Chaudhuri, R. R., la Ragione, R., Hildebrand, F., & Pallen, M. J. (2021). Extensive microbial diversity within the chicken gut microbiome revealed by metagenomics and culture. *PeerJ*, *9*.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10941>

- Gomes, F., & Henriques, M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
- Gómez-Gómez, C., Blanco-Picazo, P., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Rodríguez-Rubio, L., Cerdà-Cuellar, M., & Muniesa, M. (2019). Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49898-0>
- González-Zorn, B., Catalan, A., Domínguez, L., Teshager, T., Porrero, C., & Moreno, M. A. (2005). Genetic basis for dissemination of *armA*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 583–585. <https://doi.org/10.1093/jac/dki246>
- Górski, A., Wazna, E., Dąbrowska, B. W., Dąbrowska, K., Światała-Jeleń, K., & Międzybrodzki, R. (2006). Bacteriophage translocation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(3), 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x>
- Gregory, A. C., Zablocki, O., Zayed, A. A., Howell, A., Bolduc, B., & Sullivan, M. B. (2020). The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host and Microbe*, 28(5), 724–740.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.003>
- Guerin, E., & Hill, C. (2020). Shining Light on Human Gut Bacteriophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00481>
- Hall, J. P. J., Brockhurst, M. A., & Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: Innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 372(1735). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>
- Hamza, D., Dorgham, S., Ismael, E., El-Moez, S. I. A., Elhariri, M., Elhelw, R., & Hamza, E. (2020). Emergence of β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at integrated fish farms. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00736-3>
- Hartinger, T., Gresner, N., & Südekum, K.-H. (2018). Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0249-x>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>
- Hatosy, S. M., & Martiny, A. C. (2015). The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7593–7599. <https://doi.org/10.1128/AEM.00736-15>
- Hayakawa, T., Tanaka, T., Sakaguchi, K., Otake, N., & Yonehara, H. (1979). A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces sp.* producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. App. Microbiol*, 25, 255–260.

- Heinrichs, M. E., Tebbe, D. A., Wemheuer, B., Niggemann, J., & Engelen, B. (2020). Impact of viral lysis on the composition of bacterial communities and dissolved organic matter in deep-sea sediments. *Viruses*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/v12090922>
- Hernández, J., Stedt, J., Bonnedahl, J., Molin, Y., Drobni, M., Calisto-Ulloa, N., Gomez-Fuentes, C., Astorga-España, M. S., González-Acuña, D., Waldenström, J., Blomqvist, M., & Olsen, B. (2012). Human-associated extended-spectrum β -lactamase in the Antarctic. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(6), 2056–2058. <https://doi.org/10.1128/AEM.07320-11>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, *4*(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Hobson, C., Chan, A. N., & Wright, G. D. (2021). The Antibiotic Resistome: A Guide for the Discovery of Natural Products as Antimicrobial Agents. *Chemical Reviews*, *121*(6), 3464–3494. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01214>
- Holmes, R. K. (2000). Biology and Molecular Epidemiology of Diphtheria Toxin and the *tox* Gene. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*, S156–S167. <https://doi.org/10.1086/315554>
- Hu, Y., Gao, G. F., & Zhu, B. (2017). The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of Medicine*, *11*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0531-x>
- Huang, D., Yu, P., Ye, M., Schwarz, C., Jiang, X., & Alvarez, P. J. J. (2021). Enhanced mutualistic symbiosis between soil phages and bacteria with elevated chromium-induced environmental stress. *Microbiome*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01074-1>
- Huh, H., Wong, S., st. Jean, J., & Slavcev, R. (2019). Bacteriophage interactions with mammalian tissue: Therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *145*, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.003>
- Humphrey, S., Fillol-Salom, A., Quiles-Puchalt, N., Ibarra-Chávez, R., Haag, A. F., Chen, J., & Penadés, J. R. (2021). Bacterial chromosomal mobility via lateral transduction exceeds that of classical mobile genetic elements. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26004-5>
- Hwengwere, K., Paramel Nair, H., Hughes, K. A., Peck, L. S., Clark, M. S., & Walker, C. A. (2022). Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment? *Microbiome*, *10*(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01250-x>
- Imamovic, L., Ballesté, E., Martínez-Castillo, A., García-Aljaro, C., & Muniesa, M. (2016). Heterogeneity in phage induction enables the survival of the lysogenic population. *Environmental Microbiology*, *18*(3), 957–969. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13151>

- Imamovic, L., Jofre, J., Schmidt, H., Serra-Moreno, R., & Muniesa, M. (2009). Phage-mediated shiga toxin 2 gene transfer in food and water. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1764–1768. <https://doi.org/10.1128/AEM.02273-08>
- Imamovic, L., Misiakou, M., van der Helm, E., Panagiotou, G., Muniesa, M., & Sommer, M. O. A. (2018). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain WG5. *Genome Announcements*, 6(2), 5–6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01403-17>
- Imamovic, L., & Muniesa, M. (2012). Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032393>
- Inchley, C. J. (1969). The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clinical and Experimental Immunology*, 5(1), 173–187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5370053>
- Iyer, R., Kalu, O., Purser, J., Norris, S., Stevenson, B., & Schwartz, I. (2003). Linear and circular plasmid content in *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infection and Immunity*, 71(7), 3699–3706. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3699-3706.2003>
- Jadeja, N. B., & Worrich, A. (2022). From gut to mud: dissemination of antimicrobial resistance between animal and agricultural niches. *Environmental Microbiology*, 1–17. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15927>
- Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. u., & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 59(2), 123–133. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800412>
- Jara, D., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., Cigarroa, C., Fernández, P., Vergara, L., Quezada-Aguiluz, M., Opazo-Capurro, A., Lima, C. A., & González-Rocha, G. (2020). Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Scientific Reports*, 10(1), 3145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60035-0>
- Jauregi, L., Epelde, L., Alkorta, I., & Garbisu, C. (2021). Antibiotic Resistance in Agricultural Soil and Crops Associated to the Application of Cow Manure-Derived Amendments From Conventional and Organic Livestock Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.633858>
- Jebri, S., Rahmani, F., & Hmaied, F. (2021). Bacteriophages as antibiotic resistance genes carriers in agro-food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 130(3), 688–698. <https://doi.org/10.1111/jam.14851>
- Jia, L., Liu, H., Zhao, N., Deng, Q., Zhu, C., & Zhang, B. (2022). Distribution and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Coastal Aquatic Ecosystems of Bohai Bay. *Water*, 14(6), 938. <https://doi.org/10.3390/w14060938>

- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., & Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Jo, H., Raza, S., Farooq, A., Kim, J., & Unno, T. (2021). Fish farm effluents as a source of antibiotic resistance gene dissemination on Jeju Island, South Korea. *Environmental Pollution*, *276*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116764>
- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugal Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, *49*, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(3), 181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Ju, F., Beck, K., Yin, X., Maccagnan, A., Mc Ardell, C. S., Singer, H. P., Johnson, D. R., Zhang, T., & Bürgmann, H. (2019). Wastewater treatment plant resistomes are shaped by bacterial composition, genetic exchange, and upregulated expression in the effluent microbiomes. *ISME Journal*, *13*(2), 346–360. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0277-8>
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., & Crook, D. W. (2009). Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(2), 376–393. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, *33*(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., & Sip, A. (2020). Effectiveness of phage-based inhibition of *Listeria monocytogenes* in food products and food processing environments. *Microorganisms*, *8*(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111764>
- Kaźmierczak, Z., Majewska, J., Milczarek, M., Owczarek, B., & Dąbrowska, K. (2021). Circulation of fluorescently labelled phage in a murine model. *Viruses*, *13*(2). <https://doi.org/10.3390/v13020297>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Kenzaka, T., Tani, K., & Nasu, M. (2010). High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *ISME Journal*, *4*(5), 648–659. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.145>

- Kim, D. W., & Cha, C. J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental and Molecular Medicine*, 53(3), 301–309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>
- Kim, D. W., Thawng, C. N., Lee, K., Wellington, E. M. H., & Cha, C. J. (2019). A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavin-dependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. *Environment International*, 127, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.046>
- Kim, K. H., Chang, H. W., Nam, Y. do, Roh, S. W., Kim, M. S., Sung, Y., Jeon, C. O., Oh, H. M., & Bae, J. W. (2008). Amplification of uncultured single-stranded DNA viruses from rice paddy soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5975–5985. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-08>
- Kools, S. A. E., Moltmann, J. F., & Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.06.003>
- Koplan, J. P., Bond, C., Merson, M. H., Reddy, S., Rodriguez, M. H., Sewankambo, N. K., Wasserheit, J. N., Global, E., Institute, H., & Woodruff Health, R. W. (2009). Towards a common definition of global health. *Lancet*, 373, 1993–1995. <https://doi.org/10.1016/S0140>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., de Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Argüello, H., Berendonk, T., Cavaco, L. M., ... Peixe, L. (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal*, 19(6), 6651. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: From microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>
- Kyuchukova, R. (2020). Antibiotic residues and human health hazard-review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(3), 664–668.
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Laconi, A., Drigo, I., Palmieri, N., Carraro, L., Tonon, E., Franch, R., Bano, L., & Piccirillo, A. (2021). Genomic analysis of extra-intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from commercial chickens. *Veterinary Microbiology*, 259, 109161. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109161>
- Lancashire, J. F., Terry, T. D., Blackall, P. J., & Jennings, M. P. (2005). Plasmid-encoded *Tet B* tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1927–1931. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1927-1931.2005>

- Lang, A. S., Westbye, A. B., & Beatty, J. T. (2017). The Distribution, Evolution, and Roles of Gene Transfer Agents in Prokaryotic Genetic Exchange. *Annual Review of Virology*, *4*, 87–104. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology>
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., & Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: Phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(7), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- Lanier, W. A., Hale, K. R., Geissler, A. L., & Dewey-Mattia, D. (2018). Chicken Liver-Associated Outbreaks of Campylobacteriosis and Salmonellosis, United States, 2000-2016: Identifying Opportunities for Prevention. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(11), 726–733. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2489>
- Larrañaga, O., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Gómez-Gómez, C., Blanch, A. R., Rodríguez-Rubio, L., & Muniesa, M. (2018). Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environment International*, *115*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.019>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lee, Y.-D., & Park, J.-H. (2016). Phage Conversion for β -Lactam Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* from Foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(2), 263–269. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08042>
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C. M., & Balcázar, J. L. (2017b). Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environmental Pollution*, *220*, 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>
- Lekunberri, I., Villagrasa, M., Balcázar, J. L., & Borrego, C. M. (2017a). Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Science of the Total Environment*, *601–602*, 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.174>
- Lenzi, L. J., Lucchesi, P. M. A., Medico, L., Burgán, J., & Krüger, A. (2016). Effect of the food additives sodium citrate and disodium phosphate on shiga toxin-producing *Escherichia coli* and production of *stx*-phages and Shiga toxin. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00992>
- Letarov, A., & Kulikov, E. (2009). The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04143.x>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(8), 514–527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>

- Lindell, D., Jaffe, J. D., Coleman, M. L., Futschik, M. E., Axmann, I. M., Rector, T., Kettler, G., Sullivan, M. B., Steen, R., Hess, W. R., Church, G. M., & Chisholm, S. W. (2007). Genome-wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution. *Nature*, 449(7158), 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature06130>
- Lindell, D., Sullivan, M. B., Johnson, Z. I., Tolonen, A. C., Rohwer, F., & Chisholm, S. W. (2004). Transfer of photosynthesis genes to and from *Prochlorococcus* viruses. *PNAS*, 101(30), 11013–11018. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401526101>
- Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J., & Abee, T. (2018). Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01502>
- Llorente, C., & Schnabl, B. (2016). Fast-Track Clearance of Bacteria from the Liver. *Cell Host and Microbe*, 20(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.012>
- Lood, R., Ertürk, G., & Mattiasson, B. (2017). Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants - Bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02298>
- López-Pérez, M., Haro-Moreno, J. M., Gonzalez-Serrano, R., Parras-Moltó, M., & Rodriguez-Valera, F. (2017). Genome diversity of marine phages recovered from Mediterranean metagenomes: Size matters. *PLoS Genetics*, 13(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007018>
- Łoś, M., & Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. In *Advances in Virus Research* (Vol. 82, pp. 339–349). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00019-4>
- Luber, P. (2009). Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? *International Journal of Food Microbiology*, 134(1–2), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.012>
- Lupo, A., Coyne, S., & Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3(18), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
- Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Jończyk-Matysiak, E., Wojciechowska, R., & Górski, A. (2017). Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0196-7>
- Madera, C., Monjardín, C., & Suárez, J. E. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7365-7371.2004>
- Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, Í., Novick, R. P., Barbé, J., & Penadés, J. R. (2006). β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors

- in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2726–2729.
<https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006>
- Majewska, J., Kaźmierczak, Z., Lahutta, K., Lecion, D., Szymczak, A., Miernikiewicz, P., Drapała, J., Harhala, M., Marek-Bukowiec, K., Jędruchniewicz, N., Owczarek, B., Górski, A., & Dąbrowska, K. (2019). Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered per os. *Frontiers in Immunology*, 10, 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02607>
- Mann, B. A., & Slauch, J. M. (1997). Transduction of Low-Copy Number Plasmids by Bacteriophage P22. *Genetics*, 146(2), 447–456. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.2.447>
- Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S. T., van Oost, J. der, de Vos, W. M., & Young, M. J. (2016). Healthy human gut phageome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(37), 10400–10405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601060113>
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 1–48. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
- Marcin, L. (2020). Strategies of phage contamination prevention in industry. *Open Journal of Bacteriology*, 4(1), 020–023. <https://doi.org/10.17352/ojb.000014>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcázar, J. L. (2014). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(7). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887), 365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
- Martínez-Rubio, R., Quiles-Puchalt, N., Martí, M., Humphrey, S., Ram, G., Smyth, D., Chen, J., Novick, R. P., & Penadés, J. R. (2017). Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. *ISME Journal*, 11(4), 1029–1042. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.163>
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M. D., & Heuzenroeder, M. W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Letters in Applied Microbiology*, 52(6), 559–564. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x>
- McKinney, C. W., Dungan, R. S., Moore, A., & Leytem, A. B. (2018). Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy010>
- McMahon, M. A. S., Blair, I. S., Moore, J. E., & Mc Dowell, D. A. (2007a). The rate of horizontal transmission of antibiotic resistance plasmids is increased in food preservation-stressed bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1883–1888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03412.x>

- McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2007b). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 211–217. <https://doi.org/10.1128/AEM.00578-06>
- Merril, C. R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N. C., Creed, G. J., Zullo, S., & Adhya, S. (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(8), 3188–3192. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3188>
- Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M. T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., & Navarro, F. (2006). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(1), 211–215. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl211>
- Miedzybrodzki, R., Switala-Jelen, K., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Przerwa, A., Lusiak-Szelachowska, M., Dabrowska, K., Kurzepa, A., Boratynski, J., Syper, D., Pozniak, G., Lugowski, C., & Gorski, A. (2008). Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Research*, *131*(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.09.013>
- Miller, R. v., & Day, M. J. (2008). Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In *Bacteriophage Ecology* (pp. 114–144). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541483.008>
- Miller, R. v., Gammon, K., & Day, M. J. (2009). Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, *55*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1139/W08-119>
- Mobarki, N., Almerabi, B., & Hattan, A. (2019). Antibiotic Resistance Crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries*, *40*(4), 561–564. <https://doi.org/10.24911/IJMDC.51-1549060699>
- Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S., & Collins, J. J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*, *499*(7457), 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature12212>
- Mohan Raj, J. R., Vittal, R., Huilgol, P., Bhat, U., & Karunasagar, I. (2018). T4-like *Escherichia coli* phages from the environment carry *bla*_{CTX-M}. *Letters in Applied Microbiology*, *67*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1111/lam.12994>
- Moore, A. M., Patel, S., Forsberg, K. J., Wang, B., Bentley, G., Razia, Y., Qin, X., Tarr, P. I., & Dantas, G. (2013). Pediatric fecal microbiota harbor diverse and novel antibiotic resistance genes. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078822>

- Morand, A., Cornu, F., Dufour, J.-C., Tsimaratos, M., Lagier, J.-C., & Raoult, D. (2019). Human Bacterial Repertoire of the Urinary Tract: A Potential Paradigm Shift. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00675-18>
- Møretrø, T., Moen, B., Heir, E., Hansen, A., & Langsrud, S. (2016). Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *237*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.016>
- Mullis, M. M., Rambo, I. M., Baker, B. J., & Reese, B. K. (2019). Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02518>
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., & Jofre, J. (2013). Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mobile Genetic Elements*, *3*(4), e25847. <https://doi.org/10.4161/mge.25847>
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., & Navarro, F. (2004). Bacteriophages and Diffusion of β -lactamase Genes. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(6), 1134–1137. <https://doi.org/10.3201/eid1006.030472>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbial Spectr. Author Manuscript*, *23*(5), 464–472. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Duarte, A. S. R., van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Smit, L. A. M., Schmitt, H., Garcia, A. D., Hansen, R. B., Petersen, T. N., Bossers, A., Ruppé, E., Lund, O., Hald, T., Pamp, S. J., Vigre, H., Heederik, D., Wagenaar, J. A., ... Aarestrup, F. M. (2018). Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, *3*(8), 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>
- Muñoz-López, M., & Garcia-Pérez, J. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, *11*(2), 115–128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
- Muurinen, J., Richert, J., Wickware, C. L., Richert, B., & Johnson, T. A. (2021). Swine growth promotion with antibiotics or alternatives can increase antibiotic resistance gene mobility potential. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84759-9>
- Muziasari, W. I., Pitkänen, L. K., Sørum, H., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2017). The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below baltic sea fish farms. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02137>
- Na, G., Wang, C., Gao, H., Li, R., Jin, S., Zhang, W., & Zong, H. (2019). The occurrence of sulfonamide and quinolone resistance genes at the Fildes Peninsula in Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, *149*, 110503. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110503>

- Nam, Y.-D., Jung, M.-J., Roh, S. W., Kim, M.-S., & Bae, J.-W. (2011). Comparative Analysis of Korean Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS ONE*, *6*(7), e22109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022109>
- Navarro, F., & Muniesa, M. (2017). Phages in the human body. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R. S., & Barr, J. J. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *MBio*, *8*(6), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17>
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *Journal of Antibiotics*, *71*(2), 153–184. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>
- Nogales, B., Lanfranconi, M. P., Piña-Villalonga, J. M., & Bosch, R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(2), 275–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x>
- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V., & Bērziņš, A. (2016). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, *66*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>
- OECD-FAO. (2018). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027*. OECD. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-en
- Øie, C. I., Wolfson, D. L., Yasunori, T., Dumitriu, G., Sørensen, K. K., McCourt, P. A., Ahluwalia, B. S., & Smedsrød, B. (2020). Liver sinusoidal endothelial cells contribute to the uptake and degradation of entero bacterial viruses. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57652-0>
- Olson, M. E. (2014). Bacteriophage Transduction in *Staphylococcus aureus*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1373, pp. 69–74). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/7651_2014_186
- Oniciuc, E.-A., Likotrafiti, E., Alvarez-Molina, A., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2019). Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. *Current Opinion in Food Science*, *30*, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>
- Ortmann, A. C., & Suttle, C. A. (2009). Determination of Virus Abundance by Epifluorescence Microscopy. In *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (Vol. 501, pp. 87–95). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_10

- O'Sullivan, L., Bolton, D., Mcauliffe, O., & Coffey, A. (2019). Annual Review of Food Science and Technology Bacteriophages in Food Applications: From Foe to Friend. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, *10*, 151–172. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818>
- Otawa, K., Lee, S. H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H., & Mino, T. (2007). Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms in activated sludge processes. *Microbial Ecology*, *53*(1), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9150-9>
- Paun, V. I., Lavin, P., Chifiriuc, M. C., & Purcarea, C. (2021). First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79754-5>
- Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, *23*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>
- Penadés, J. R., & Christie, G. E. (2015). The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annual Review of Virology*, *2*, 181–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085446>
- Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Meisel, L. M., & Pena, A. (2015). Fluoroquinolones and Tetracycline Antibiotics in a Portuguese Aquaculture System and Aquatic Surroundings: Occurrence and Environmental Impact. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *78*(15), 959–975. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1036185>
- Podlacha, M., Grabowski, Ł., Kosznik-Kawśnicka, K., Zdrojewska, K., Stasiłojć, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Interactions of bacteriophages with animal and human organisms—safety issues in the light of phage therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168937>
- Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Georgia Ștefan, M., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and Pharmacy Reports*, *93*(3), 231–240. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>
- Popescu, M., van Belleghem, J. D., Khosravi, A., & Bollyky, P. L. (2021). Bacteriophages and the Immune System. *Annual Review of Virology*, *8*, 415–435. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919>
- Pou, C., Barrientos-Somarribas, M., Marin-juan, S., Bogdanovic, G., & Bjerkner, A. (2018). Virome definition in cerebrospinal fluid of patients with neurological complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Virology*, *108*(May), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.09.014>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, *109*(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>

- Pride, D. T., Salzman, J., Haynes, M., Rohwer, F., Davis-Long, C., White, R. A., Loomer, P., Armitage, G. C., & Relman, D. A. (2012). Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME Journal*, 6(5), 915–926.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.169>
- Programa REDUCE pollos broiler | PRAN. (2020). *Acuerdo para el desarrollo del Programa y Uso Razonable de Antibióticos en Pollos Broiler* (pp. 1–5). Plan Nacional Resistencia Antibióticos (PRAN).
https://www.resistenciaantibioticos.es/es/system/files/content_images/2020.07.22_acuerdo_base_broiler_entidades.pdf
- Przerwa, A., Zimecki, M., Świtała-Jeleń, K., Dąbrowska, K., Krawczyk, E., Łuczak, M., Weber-Dąbrowska, B., Syper, D., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2006). Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(3), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s00430-006-0011-4>
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X. J., Su, J. Q., & Stedfeld, R. (2018). Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 716–722.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.020>
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698.
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F., & Muniesa, M. (2014). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 606–609.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Ramisetty, B. C. M., & Sudhakari, P. A. (2019). Bacterial “grounded” prophages: Hotspots for genetic renovation and innovation. *Frontiers in Genetics*, 10, 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00065>
- Ravi, A., Avershina, E., Foley, S. L., Ludvigsen, J., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., McCartney, A. L., L’Abée-Lund, T. M., & Rudi, K. (2015). The commensal infant gut meta-mobilome as a potential reservoir for persistent multidrug resistance integrons. *Scientific Reports*, 5(1), 15317.
<https://doi.org/10.1038/srep15317>
- Reavy, B., Swanson, M. M., Cock, P. J. A., Dawson, L., Freitag, T. E., Singh, B. K., Torrance, L., Mushegian, A. R., & Taliansky, M. (2015). Distinct circular single-stranded DNA viruses exist in

- different soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 3934–3945.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03878-14>
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466(7304), 334–338. <https://doi.org/10.1038/nature09199>
- Riedel, T., Wittmann, J., Bunk, B., Schober, I., Spröer, C., Gronow, S., & Overmann, J. (2017). A *Clostridioides difficile* bacteriophage genome encodes functional binary toxin-associated genes. *Journal of Biotechnology*, 250, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.017>
- Ripp, S., & Miller, R. v. (1997). The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology*, 143(6), 2065–2070.
<https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-2065>
- Rodríguez-Rubio, L., Haarmann, N., Schwidder, M., Muniesa, M., & Schmidt, H. (2021). Bacteriophages of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and their contribution to pathogenicity. *Pathogens*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens10040404>
- Rodríguez-Rubio, L., Serna, C., Ares-Arroyo, M., Matamoros, B. R., Delgado-Blas, J. F., Montero, N., Bernabe-Balas, C., Wedel, E. F., Mendez, I. S., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2020). Extensive antimicrobial resistance mobilization via multicopy plasmid encapsidation mediated by temperate phages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3173–3180.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkaa311>
- Roshini, J., & Karunasagar, I. (2017). Prevalence of *bla*_{CTX-M-15} in Coliphages Isolated from Sewage. *Advanced Science Letters*, 23, 1869–1871. <https://doi.org/10.1166/asl.2017.8511>
- Ross, J., & Topp, E. (2015). Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7905–7913.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02363-15>
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

- Rusckowski, M., Gupta, S., Liu, G., Dou, S., & Hnatowich, D. J. (2008). Investigation of four ^{99m}Tc-labeled bacteriophages for infection-specific imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, 35(4), 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.02.011>
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., & Oguma, K. (2005). The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(48), 17472–17477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505503102>
- Salama, Y., Salama, O., el Amraoui, M., & Chennaoui, M. (2021). Assessment of bacterial contamination of *Mytilus galloprovincialis*, *Cardium edule* and water quality in Bouregreg estuary (Morocco, Atlantic Ocean). *SN Applied Sciences*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04008-y>
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews*, 13(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Santiago-Rodriguez, T. M., Ly, M., Bonilla, N., & Pride, D. T. (2015). The human urine virome in association with urinary tract infections. *Frontiers in Microbiology*, 6(14), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00014>
- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4(2). <https://doi.org/10.4161/bact.28137>
- Schneider, C. L. (2017). Bacteriophage-Mediated Horizontal Gene Transfer: Transduction. In *Bacteriophages* (pp. 1–42). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_4-1
- Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S., & Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 127–134. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12011>
- Sevilla-Navarro, S., Catalá-Gregori, P., & Marin, C. (2020). Salmonella bacteriophage diversity according to most prevalent salmonella serovars in layer and broiler poultry farms from Eastern Spain. *Animals*, 10(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ani10091456>
- Shang, J., Jiang, J., & Sun, Y. (2021). Bacteriophage classification for assembled contigs using graph convolutional network. *Bioinformatics*, 37, 125–133. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab293>

- Sherlock, D., Leong, J. X., & Fogg, P. C. M. (2019). Identification of the First Gene Transfer Agent (GTA) Small Terminase in *Rhodobacter capsulatus* and Its Role in GTA Production and Packaging of DNA. *Journal of Virology*, *93*(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.01328-19>
- Shkoporov, A. N., & Hill, C. (2019). Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host & Microbe*, *25*(2), 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>
- Shousha, A., Awaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F. J. M., Paulsen, P., Szostak, M. P., Humphrey, T., & Hilbert, F. (2015). Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(14), 4600–4606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-15>
- Sime-Ngando, T. (2014). Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00355>
- Simmonds, P., Adams, M. J., Benk, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M. Q., Koonin, E. v., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., ... Zerbini, F. M. (2017). Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(3), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., & Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, *325*(5944), 1128–1131. <https://doi.org/10.1126/science.1176950>
- Sørensen, P. E., van den Broeck, W., Kiil, K., Jasinskyte, D., Moodley, A., Garmyn, A., Ingmer, H., & Butaye, P. (2020). New insights into the biodiversity of coliphages in the intestine of poultry. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72177-2>
- Sousa, C. P. de. (2008). The impact of food manufacturing practices on food borne diseases. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *51*(4), 615–623. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000400020>
- Souza, A. I. S., Saraiva, M. M. S., Casas, M. R. T., Oliveira, G. M., Cardozo, M. v., Benevides, V. P., Barbosa, F. O., Freitas Neto, O. C., Almeida, A. M., & Junior, A. B. (2020). High occurrence of β -lactamase-producing *Salmonella Heidelberg* from poultry origin. *PLoS ONE*, *15*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230676>
- Spencer, L., Olawuni, B., & Singh, P. (2022). Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706>
- Srinivasiah, S., Bhavsar, J., Thapar, K., Liles, M., Schoenfeld, T., & Wommack, K. E. (2008). Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Research in Microbiology*, *159*(5), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.010>

- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M.-C. (2012). Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., & MacKenzie, F. M. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030>
- Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions. *Viruses*, 11(6), 567. <https://doi.org/10.3390/v11060567>
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., & Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.028>
- Sukumar, S., Roberts, A. P., Martin, F. E., & Adler, C. J. (2016). Metagenomic Insights into Transferable Antibiotic Resistance in Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(9), 969–976. <https://doi.org/10.1177/0022034516648944>
- Sullivan, M. B., Lindell, D., Lee, J. A., Thompson, L. R., Bielawski, J. P., & Chisholm, S. W. (2006). Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS Biology*, 4(8), 1344–1357. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040234>
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews*, 5(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Suttle, C. A., & Chan, A. M. (1993). Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 99–109. <https://doi.org/10.3354/meps092099>
- Suzuki, T. A., & Worobey, M. (2014). Geographical variation of human gut microbial composition. *Biology Letters*, 10(2), 20131037. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.1037>
- Sweere, J. M., van Belleghem, J. D., Ishak, H., Bach, M. S., Popescu, M., Sunkari, V., Kaber, G., Manasherob, R., Suh, G. A., Cao, X., de Vries, C. R., Lam, D. N., Marshall, P. L., Birukova, M., Katznelson, E., Lazzareschi, D. v., Balaji, S., Keswani, S. G., Hawn, T. R., ... Bollyky, P. L. (2019). Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science*, 363(6434). <https://doi.org/10.1126/science.aat9691>
- Switt, A. I., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L. D., Cummings, K. J., & Wiedmann, M. (2013). Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiology*, 36(2), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>

- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F. E., Nakamura, S., Hong, P. Y., Yasunaga, T., Kamagata, Y., & Liu, W. T. (2012). Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environmental Microbiology*, *14*(2), 441–452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>
- Tamminen, M., Karkman, A., Löhmus, A., Muziasari, W. I., Takasu, H., Wada, S., Suzuki, S., & Virta, M. (2011). Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. *Environmental Science and Technology*, *45*(2), 386–391. <https://doi.org/10.1021/es102725n>
- Tan, L., Li, L., Ashbolt, N., Wang, X., Cui, Y., Zhu, X., Xu, Y., Yang, Y., Mao, D., & Luo, Y. (2018). Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Science of the Total Environment*, *621*, 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>
- Tekiner, İ. H., & Özpınar, H. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*(2), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>
- The Commission of the European Communities. (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. In *Official Journal of the European Union* (pp. 1–26). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=EN>
- The European Parliament and the council of the European Union. (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. In *Official Journal of the European Union* (pp. 29–43). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN>
- Thierauf, A., Perez, G., & Maloy, and S. (2009). Generalized Transduction. In *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (pp. 267–286). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_23
- Tin, T., Fleming, Z. L., Hughes, K. A., Ainley, D. G., Convey, P., Moreno, C. A., Pfeiffer, S., Scott, J., & Snape, I. (2009). Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science*, *21*(1), 3–33. <https://doi.org/10.1017/S0954102009001722>
- Tóth, I., Schmidt, H., Dow, M., Malik, A., Oswald, E., & Nagy, B. (2003). Transduction of Porcine Enteropathogenic *Escherichia coli* with a Derivative of a Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophage in a Porcine Ligated Ileal Loop System. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(12), 7242–7247. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003>
- Tzani-Tzanopoulou, P., Skliros, D., Megremis, S., Xepapadaki, P., Andreacos, E., Chanishvili, N., Fletmetakis, E., Kaltsas, G., Taka, S., Lebessi, E., Doudoulakakis, A., & Papadopoulos, N. G.

- (2021). Interactions of Bacteriophages and Bacteria at the Airway Mucosa: New Insights Into the Pathophysiology of Asthma. *Frontiers in Allergy*, 1. <https://doi.org/10.3389/falgy.2020.617240>
- Ubukata, K., Konno, M., & Fujii, R. (1975). Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Antibiotics*, 28(9), 681–688. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.681>
- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Pala-Ozkok, I. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
- US.EPA. (2016). 2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. In *Office of Water* (Issue July, pp. 1–2). <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-03/documents/coliphage-experts-workshop-factsheet-2016.pdf>
- van Belleghem, J., Dąbrowska, K., Vaneechoutte, M., Barr, J., & Bollyky, P. (2018). Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.3390/v11010010>
- van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., van de Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhanyane, T. P. (2018). A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>
- van Schaik, W. (2015). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 370(1670), 20140087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0087>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H. M., & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*, 272(5270), 1910–1914. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
- Wang, F., Stedtfeld, R. D., Kim, O. S., Chai, B., Yang, L., Stedtfeld, T. M., Hong, S. G., Kim, D., Lim, H. S., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Sul, W. J. (2016). Influence of soil characteristics and proximity to Antarctic research stations on abundance of antibiotic resistance genes in soils. *Environmental Science and Technology*, 50(23), 12621–12629. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02863>

- Wang, M., Liu, P., Zhou, Q., Tao, W., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. *Environmental Pollution*, 238, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.024>
- Wang, M., Sun, Y., Zeng, Z., & Wang, Z. (2021). Metagenomics of wastewater phageome identifies an extensively cored antibiotic resistome in a swine feedlot water treatment environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112552>
- Watford, S., & Warrington, S. J. (2022). Bacterial DNA Mutations. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083710>
- Wei, S. T. S., Higgins, C. M., Adriaenssens, E. M., Cowan, D. A., & Pointing, S. B. (2015). Genetic signatures indicate widespread antibiotic resistance and phage infection in microbial communities of the McMurdo Dry Valleys, East Antarctica. *Polar Biology*, 38(6), 919–925. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1649-4>
- Weinbauer, M. G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
- WHO. (2017a). *One Health*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>
- WHO. (2017b). *Potable reuse: guidance for producing safe drinking-water*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258715/9789241512770-eng.pdf>
- WHO. (2022). *Antimicrobial resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Williamson, K. E., Fuhrmann, J. J., Wommack, K. E., & Radosevich, M. (2017). Viruses in soil Ecosystems: An Unknown Quantity Within an Unexplored Territory. *Annu. Rev. Virol*, 4, 201–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology>
- Williamson, K. E., Radosevich, M., & Wommack, K. E. (2005). Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3119–3125. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3119-3125.2005>
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F. E., Silva, J., Tammadoni, S., Nosrat, B., Conrad, D., & Rohwer, F. (2009). Metagenomic Analysis of Respiratory Tract DNA Viral Communities in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Individuals. *PLoS ONE*, 4(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007370>
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G. J., & Weinbauer, M. G. (2004). Impact of Virioplankton on Archaeal and Bacterial Community Richness as Assessed in Seawater Batch Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 804–813. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.804-813.2004>

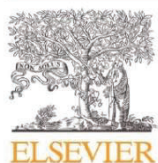
- Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(8), 552–563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>
- Wu, C., Lin, C., Zhu, X., Liu, H., Zhou, W., Lu, J., Zhu, L., Bao, Q., Cheng, C., & Hu, Y. (2018). The β -lactamase gene profile and a plasmid-carrying multiple heavy metal resistance genes of *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Genomics*, *2018*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/4989602>
- Wu, N., Qiao, M., Zhang, B., Cheng, W. da, & Zhu, Y. G. (2010). Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. *Environmental Science and Technology*, *44*(18), 6933–6939. <https://doi.org/10.1021/es1007802>
- Wu, S., Carvalho, P. N., Müller, J. A., Remony, V., & Dong, R. (2016). Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. *Science of the Total Environment*, *541*, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.047>
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *52*(47), 1–7. <http://www.actavetscand.com/content/52/1/47>
- Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., Li, A., Zeng, Z., & Zhang, T. (2018). Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, *6*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2>
- Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Nakasone, K., Ohnishi, M., Nakayama, K., Yamada, S., Komatsuzawa, H., & Sugai, M. (2000). Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *38*(4), 694–705. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02169.x>
- Ye, Q., Wu, Q., Zhang, S., Zhang, J., Yang, G., Wang, J., Xue, L., & Chen, M. (2018). Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from retail food in China. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01709>
- Zaffiri, L., Gardner, J., & Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, *25*(2), 67–77. <https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>
- Zárate, S., Taboada, B., Yocupicio-Monroy, M., & Arias, C. F. (2017). Human Virome. *Archives of Medical Research*, *48*(8), 701–716. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.01.005>
- Zeaki, N., Susilo, Y. B., Pregiel, A., Rådström, P., & Schelin, J. (2015). Prophage-encoded staphylococcal enterotoxin a: Regulation of production in *Staphylococcus aureus* strains representing different sea regions. *Toxins*, *7*(12), 5359–5376. <https://doi.org/10.3390/toxins7124889>

- Zhang, S., Huang, J., Zhao, Z., Cao, Y., & Li, B. (2020). Hospital Wastewater as a Reservoir for Antibiotic Resistance Genes: A Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.574968>
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zinke, M., Schröder, G. F., & Lange, A. (2022). Major tail proteins of bacteriophages of the order *Caudovirales*. *Journal of Biological Chemistry*, 298(1), 101472. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101472>
- Zrelavs, N., Dislers, A., & Kazaks, A. (2020). Motley Crew: Overview of the Currently Available Phage Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579452>
- Zuppi, M., Hendrickson, H. L., O'Sullivan, J. M., & Vatanen, T. (2022). Phages in the Gut Ecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.822562>

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Otras publicaciones del doctorando

Water Research 184 (2020) 116215



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watresF-specific coliphage detection by the *Bluephage* method

Daniel Toribio-Avedillo, Julia Martín-Díaz, Pedro Blanco-Picazo, Anicet R. Blanch, Maite Muniesa*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Barcelona E-08028, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2020

Revised 16 July 2020

Accepted 20 July 2020

Available online 21 July 2020

Keywords:

Viral indicator

Fecal pollution

Coliphages

F-specific coliphages

Virus

New tools

Glucuronidase

ABSTRACT

F-specific coliphages have been proposed as viral indicators of fecal pollution. These intestinal phages infect cells through the F-pili of the host strains used for their detection, *Escherichia coli* HS/Famp in the US-EPA standard method and *Salmonella enterica* WG49 in the ISO method.

The recently designed *Bluephage* protocol allows the rapid detection of as low as one somatic coliphage in a working day. The current study describes a new *Bluephage* method designed to exclusively detect F-specific phages. It employs two new host strains, CB14 and CB16, which detect the same number of F-specific phages as their respective parental strains HS and WG49. In the *Bluephage* method, when the strain is lysed by bacteriophage infection, the yellow medium turns blue. As low as one F-specific phage was detected in 3 to 5 h by this approach and when the sample contained high phage concentrations, results were obtained in less than 3 h. The F-specific *Bluephage* method can be used with different sample volumes and allows phage quantification by the most probable number technique. Strain CB14 performed more consistently than CB16, with comparable detection efficiency after increasing the incubation time to 50 min without shaking.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fecal water pollution has been linked with pathogen transmission for centuries and is still causing thousands of human deaths daily (Naughton, Coleen, and Mihelcic, 2017). Traditionally, bacterial indicators such as *Escherichia coli* have been used to determine the levels of fecal pollution in water and food. Nevertheless, the diversity of pathogens and the inability of bacterial indicators to predict the risk of viral or protozoan contamination in these environments has prompted a search for new indicators (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Muniesa and Jofre, 2007; WHO, 2017). In this scenario, several groups of bacteriophages have been proposed as indicators of viral fecal pollution, particularly in water, including somatic coliphages, F-specific RNA coliphages and some phages infecting *Bacteroides* (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991).

Since the elaboration of standardized methods for the detection of somatic (Anonymous, 2000) and F-specific RNA coliphages (Anonymous, 1995), coliphages have been progressively included in several guidelines around the globe (Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015; République Française, 2014; Western Australian Gov-

ernment, 2012), including water quality regulations in the USA (Nappier et al., 2019; U.S. EPA, 2015) and new directives in the EU for drinking and reused water (Council of the European Union, 2020).

The increasing interest in coliphage detection has created a demand for user-friendly and cost-effective methods that are feasible for routine analysis laboratories. Although standardized methods for detecting F-specific coliphages are available (Anonymous, 1995; U.S. EPA, 2001a, 2001b), they are not easy to implement, require previous preparation of calibrated biological materials, and in the best of cases, in the hands of qualified analysts, take more than 8 h to yield results. As a consequence, alternatives have been proposed (Muniesa et al., 2018; Rames and Macdonald, 2019), including the *Bluephage* method, which detects somatic coliphages using an *E. coli* strain genetically modified in the operon responsible for glucuronic acid metabolism (Liang et al., 2005). The modifications consist of knocking out glucuronic acid transporter genes (*uidB* and *uidC*) and overexpression of the β -glucuronidase gene (*uidA*), which leads to the accumulation of β -glucuronidase in the cytoplasm of the bacterial host cell. After lytic phage infection, the yellow medium turns blue as the released enzyme encounters its chromogenic substrate. *Bluephage* allows the detection of as low as 1 coliphage in under 4 h, and is the fastest method currently available for infectious somatic coliphages (Muniesa et al., 2018) and total coliphages (Toribio-Avedillo et al., 2019).

* Corresponding author.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

Original Research

Bacteriophages immunomodulate the response of monocytes

Lidia Perea^{1,*} , Lorena Rodríguez-Rubio^{2,*}, Juan C Nieto¹, Carlos Zamora¹, Elisabet Cantó¹, German Soriano^{3,4}, Maria Poca^{3,4}, Pedro Blanco-Picazo², Ferran Navarro^{5,6} , Maite Muniesa² and Silvia Vidal¹

¹Inflammatory Diseases, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona 08041, Spain; ²Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain; ³Department of Gastroenterology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08041, Spain; ⁴CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Autonomous University of Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain; ⁵Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08041, Spain. Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; ⁶Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

Corresponding author: Silvia Vidal. Email: svidal@santpau.cat

*These authors contributed equally to this work.

Impact statement

It is known that patients with liver cirrhosis have phages in their ascitic fluids. Our work demonstrates that phages induce an immune response in healthy monocytes, in terms of phenotype, production of soluble factors, and phagocytosis function. Furthermore, our work validates the usefulness of polymyxin B and 1-butanol protocol as easy strategies to discard the interference of bacterial products in the phage suspensions.

Abstract

Bacteriophages are present in fluids from cirrhosis patients. However, their effect on the immune response is unknown. In this work, we explore the role of phages in the phenotype, function, and cytokine production of monocytes. We stimulated healthy monocytes with five different butanol-purified phage suspensions infective for Gram-negative and Gram-positive bacteria. We studied the expression of the monocyte markers involved in lipopolysaccharide recognition (LPS; CD14), antigen presentation (HLA-DR) and co-stimulation (CD86), and the concentration of induced cytokines (TNF- α , IFN- α , and IL-10) by phages. To confirm the direct role of phages without the interference of contaminating soluble LPS in

phage suspensions, polymyxin B was added to the cell cultures. Phagocytosis experiments were assessed by flow cytometry using labeled phage suspensions. We observed that butanol-purified phages reduced the surface levels of CD14 and CD86 in monocytes and increased the secreted levels of TNF- α and IL-10 compared with the control sample containing only butanol buffer. All phage suspensions showed downregulation of HLA-DR expression but only *Staphylococcus aureus* phage contaminated with *Escherichia coli* reached statistical significance. The addition of polymyxin B did not restore the monocytic response induced by phages, suggesting that the effect was not caused by the presence of LPS. Monocytes were able to phagocytose phages in a dose- and time-dependent manner. To conclude, the phagocytosis of butanol-purified phages altered the phenotype and cytokine production of monocytes suggesting they become tolerogenic.

Keywords: Bacteriophages, immunity, cirrhosis

Experimental Biology and Medicine 2021; 246: 1263–1268. DOI: 10.1177/1535370221995154

Introduction

Bacteriophages, also called phages, are viruses present in 45% of the ascitic fluid (AF) samples from patients with spontaneous bacterial peritonitis (SBP).^{1,2} SBP, which is the most severe complication in patients with liver cirrhosis, is generated by the translocation of bacteria from the gut to the peritoneal cavity caused by an increased intestinal permeability.³ The diagnosis of SBP is based on a positive bacteriological culture result and a count of polymorphonuclear cells above 250 cells/mm³ in the AF.

However, bacteria are not detected in a half of the patients with >250 cells/mm³ in AF. Interestingly, these patients have a similar severity and prognosis than those patients with positive bacteriological result,⁴ suggesting that not only the presence of bacteria in AF induces an immune response.

Bacterial cells are infected by specific phages through lysogenic cycles and then, bacteria are lysed through lytic cycles.⁵ Although phages do not infect eukaryotic cells, immune cells can be stimulated directly by phages or



Prevalence of bacterial genes in the phage fraction of food viromes

Pedro Blanco-Picazo^a, Clara Gómez-Gómez^a, Marc Tormo^{b,c}, Maria Dolores Ramos-Barbero^a, Lorena Rodríguez-Rubio^{a,*}, Maite Muniesa^{a,*}

^a Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, E-08028 Barcelona, Spain

^b Genomics Core Facility, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain

^c Scientific IT Core Facility, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibiotic resistance gene
Transduction
Bacteriophages
Viromes
Food safety

ABSTRACT

Antibiotic resistance genes (ARGs) have been identified in viral DNA isolated from different kinds of food, but little is known about their origin. In this study, twenty-one viromes were analyzed from samples of food previously reported to carry ARGs, including meat (poultry, veal, and pork), fish (Mediterranean, Atlantic, frozen, farmed and shellfish) and vegetables (lettuce, cucumber, and spinach). Classification of the contigs by Kraken revealed a large percentage of unclassified contigs (43.7–98.2%) in all the viromes. Only 0.05–7.1% of the contigs were identified as viral and of these, more than 91% belonged to different bacteriophage families, Podophages and Siphophages being the most prevalent. According to ViSorter, the largest number of viral contigs were derived from viromes of shellfish, followed by spinach. Spinach viromes also included the largest number of phage sequences identified by PHASTER. The abundant presence of bacterial genes in the viromes, including *16S rRNA* genes, was attributed to the phage packaging of the bacterial genome fragments, as no bacterial DNA was found outside the viral capsids. The detection of *16S rRNA* genes in the different viromes allowed diverse phage bacterial hosts to be identified. The three major functional groups of genes determined were related to metabolism, detoxification/resistance, and above all, biosynthesis. Various ARGs were quantified in the viromes by qPCR, the most prevalent being β -lactamases, particularly *bla*_{TEM}. Analysis of ARG diversity in the viromes by Prokka and CARD revealed various resistance-related genes, whereas a more restrictive search by ResFinder identified *bla*_{TEM} in all the food viromes, *bla*_{OXA} in Atlantic fish-1 and spinach-2, *oqx*B in lettuce-1, and *df*r in spinach-2. The presence of ARGs in the food viromes points to bacterial DNA mobilization by transduction mechanisms. Transduction of resistances by phage particles may therefore contribute to the emergence of resistant strains along the food chain and should be monitored.

1. Introduction

The study of viromes is an expanding field, and the development of more reliable shotgun sequencing techniques has provided new insights into the role of viruses in microbial communities (Norman et al., 2015; Reyes et al., 2010; Roux et al., 2016). Microbiome sequencing mainly generates data about the bacterial fraction, as most of the total DNA extracted from a microbiome is bacterial. Although progress in virome research has fed the genetic databases with new sequences, viral genomes remain under-represented (Chatterjee & Duerkop, 2018; Gregory et al., 2020; Pérez-Cataluña et al., 2021; Wang, 2020).

When analyzing a virome, purification of viral particles and removal

of external non-viral DNA is essential to enrich viral sequences. Although bioinformatic analysis can help to remove non-viral sequences, the large number of unidentified viral contigs (also known as viral dark matter) implies that only a small percentage of viral sequences can be identified, particularly in complex samples, and most of the viral sequences correspond to bacteriophages (Cantalupo et al., 2011; Pérez-Cataluña et al., 2021).

Phages can mobilize a single bacterial gene inserted in the phage genome (specialized transduction) or a large fragment of bacterial DNA encapsidated during phage assembly (generalized or lateral transduction) (Chiang et al., 2019). When analyzing the extent to which transduction events in a virome are driven by bacteriophages,

* Corresponding authors.

E-mail addresses: lorenarodriguez@ub.edu (L. Rodríguez-Rubio), mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111342>

Received 24 February 2022; Received in revised form 15 April 2022; Accepted 3 May 2022

Available online 7 May 2022

0963-9969/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

8.2. Anexo 2: Medios de cultivo y tampones

2.1. Medios de cultivo

Caldo LB (*Luria-Bertani*):

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

LB ss (semisólido):

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 7,5 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

Agar LB:

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

TSA (*Trypticasein Soy Agar*):

- 40 g TSA comercial
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

MSB (Modified Scholtens Broth):

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Guardar a temperatura ambiente o 4°C. Ajustar el pH a 7,0-7,5 antes de su uso.

MSA (Modified Scholtens Agar):

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

MSA ss (semisólido):

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (1M)
- 7,5 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C 15 min. Una vez estéril, suplementar con 6ml de CaCl₂ (1M) y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

Caldo marino (*Marine Broth*):

- 5 g Peptona
- 1g Extracto de levadura
- 19,45 g NaCl
- 5,9 g MgCl₂
- 3,24 g MgSO₄
- 1,8 g CaCl₂
- 0,55 g KCl
- 0,1 g Citrato férrico
- 0,16 g NaHCO₃
- 0.08 g KBr
- Trazas Estroncio
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

Agar Chromocult®:

- 26,5 g Chromocult® (Merck-Millipore)
- 1 L H₂O destilada

Disolver con calor y suave agitación. Cuando el agua empiece a hervir, dejar enfriar hasta los 45-50°C y añadir el suplemento (4ml de suplemento selectivo *E. coli* coliformes por litro). Guardar las placas a 4°C.

Agar MacConkey:

- 20 g Peptona
- 10 g Lactosa
- 5 g Sales biliares
- 75 mg Rojo neutro
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

Agar M para enterococos:

- 20 g Triptosa
- 5 g Extracto de levadura
- 2 g Dextrosa
- 4 g Fosfato dipotásico
- 0,4 g Azida sódica
- 0,1 g 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro
- 10 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a 4°C.

Agar Bilis Esculina:

- 3 g Extracto de carne
- 5 g Peptona
- 20 g Sales biliares
- 0,5 g Citrato férrico
- 1 g Esculina
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar las placas a 4°C.

2.2. Tampones y disoluciones

PBS (*Phosphate Buffered Saline*):

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,2 g KH₂PO₄
- 1,15 g Na₂HPO₄ · 7 H₂O
- 1 L H₂O bidestilada

Ajustar el pH a 7,1-7,2. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente.

Tampón de fagos:

- 7 g Na_2HPO_4
- 1,5 g KH_2PO_4
- 5 g NaCl
- 1 L de H_2O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Tras su enfriamiento suplementar con 10ml de MgSO_4 0,1M y 10 ml de CaCl_2 0,01M y guardar a temperatura ambiente.

Tampón proteinasa K:

- 2 ml Tris HCl 1M pH 8
- 2 ml EDTA 0,5 M pH 8
- 10 ml SDS 10%
- Enrasar a 100 ml con H_2O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

El tampón proteinasa K se usa junto con la Proteinasa K de Roche® (concentración final 20 mg/ml).

Tampón de diálisis:

- 12,11 g Tris Base
- 0,074 g EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Titrplex®)
- 1 L H_2O bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparar antes de usar.

Tampón de lavado (membranas de diálisis):

- 20 g NaHCO_3
- 0,37 g EDTA
- 1 L H_2O bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparar antes de usar.

Tampón EDTA (membranas de diálisis):

- 0,37 g EDTA
- 1 L H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 8. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos. Preparar antes de usar.

Tampón 0.1M EDTA-0.2M MgCl₂-0.2M ácido ascórbico (recuperación fagos Antártida):

- 1,51 g Tris base
- 4,07 g MgCl₂·6H₂O
- 3,72 g EDTA
- 3,52 g Ácido ascórbico
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 6 con una solución de NaOH 5M. Preparar antes de usar.

NaOH 5M:

- 20 g NaOH
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Almacenar a temperatura ambiente.

Mitomicina C:

- 0,5 mg Mitomicina C (Sigma-Aldrich)
- 1 ml H₂O bidestilada estéril

Disolver por agitación y almacenar a 4°C en oscuridad. Utilizar fresca. Si no fuera posible, no utilizar después de un mes tras su preparación.

ADNasa (10mg/ml):

- 10 mg de ADNasa (Roche®)
- 1 ml H₂O bidestilada estéril

Disolver por agitación. Almacenar a -20°C.

Proteinasas K (20mg/ml):

- 20 mg proteinasa K (Roche®)
- 1 ml H₂O bidestilada estéril

Disolver por agitación. Almacenar a -20°C.

Acetato de sodio (3M):

- 24,6 g acetato de sodio
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

Etanol 70%:

- 70 ml EtOH 100%
- 30 ml H₂O bidestilada

Almacenar a temperatura ambiente.

CaCl₂ 1M:

- 11,1 g CaCl₂
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros ésteres mixtos de celulosa (MCE) de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Almacenar a 4°C.

Na₂CO₃ (15%):

- 15 g Na₂CO₃
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Almacenar a temperatura ambiente y oscuridad.

CaCl₂ 0,01M:

- 0,11 g CaCl₂
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Almacenar a 4°C.

MgSO₄ 0,1M:

- 2,47 g MgSO₄·7H₂O
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Almacenar a 4°C.

FeCl₃ (10g/L):

- 1 g FeCl₃ 6H₂O
- 100 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Almacenar a 4°C.

Molibdato de amonio 2% (p/V) pH 7:

- 0,2 g molibdato de amonio
- 10 ml H₂O bidestilada

Disolver por agitación. Ajustar pH a 7. Esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Almacenar a 4°C.

Ampicilina 100 mg/ml (concentración stock):

- 1 g ampicilina
- 10 ml H₂O bidestilada

Disolver y esterilizar por filtración con filtros MCE de alta adsorción proteica de 0,22 µm. Repartir en alícuotas de 1 ml en tubos de microcentrifuga (Eppendorf). Almacenar a -20°C. Concentración de trabajo de 100 µg/ml.

8.3. Anexo 3: Protocolos realizados

3.1. Homogenización de muestras

Se pesaron 20 g de las matrices sólidas alimentarias y se homogenizaron en 60 ml de tampón de fagos, utilizando un homogenizador de palas Stomacher (IUL Instruments GmbH) durante 5 minutos. Para facilitar la separación de los residuos sólidos de la fracción líquida (que contiene los microorganismos) se utilizaron bolsas de Stomacher con filtro (Afora).

Las matrices líquidas (leche y horchata) se diluyeron 1/3 (20 ml de muestra con 60 ml de tampón de fagos) y se homogenizaron manualmente en contenedores estériles de 100 ml hasta obtener una mezcla homogénea.

En el caso de hígados de pollo, se pesaron 10 g de hígado y se homogenizaron en 40 ml de tampón de fagos, utilizando un agitador horizontal durante 10 minutos. Para favorecer la ruptura de los tejidos hepáticos se utilizaron bolas de vidrio de 1 y 3 mm (Hecht Assistant®).

3.2. Análisis de indicadores bacterianos

Los homogenados se utilizaron para el análisis de los siguientes indicadores bacterianos:

- Aerobios totales resistentes a ampicilina (100 µg/ml): Para el análisis de estos indicadores se realizó una siembra por extensión en placa. A partir de un banco de diluciones seriadas 1/10 del homogenado, se añadieron 100 µl de muestra sobre placas de TSA (Condalab) con ampicilina (100 µg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h.
- *E. coli* y *E. coli* resistentes a ampicilina (alimentos): se analizaron mediante una siembra en masa mezclando 1 ml del homogenado con 10 ml de Chromocult® (Merck-Millipore) /Chromocult® con ampicilina (100 µg/ml) estéril. La mezcla se depositó en placas de Petri estériles y se dejó solidificar. Una vez solidificado el medio, se dejó unas 2 horas a 37°C para promover la adaptación de los microorganismos. Tras este periodo de incubación, las placas se incubaron a 44°C durante 18 h para favorecer el crecimiento de los coliformes y *E. coli*. Las presuntas *E. coli* crecidas en este medio se confirmaron posteriormente en agar MacConkey (Condalab).
- *Enterococcus spp* (pescados y mariscos): el análisis de enterococos totales se realizó mediante una filtración por membranas siguiendo la normativa ISO 7899-2:2000 para

la detección y enumeración de enterococos intestinales. Las muestras se diluyeron 1/10 en PBS y se filtraron 10 ml a través de filtros de ésteres mixtos de celulosa (MCE) EZ-Pak® (Merck-Millipore) de tamaño de poro de 0,45 µm. Los filtros se incubaron a 37°C durante 48 horas en placas de agar M para enterococos. Las colonias sospechosas (color negro) se confirmaron mediante su crecimiento en agar bilis esculina a 44°C durante 3 horas.

3.3. Purificación de bacteriófagos

Los homogenados se centrifugaron 15 minutos a 4000 x g para separar la fracción fágica de la fracción bacteriana y otras partículas. Posteriormente, el sobrenadante, que contiene las partículas fágicas, se filtró por filtros de polietersulfona (PES) de baja adsorción proteica de 0,22 µm (Millex-GP, Merck-Millipore), que permite el paso de las partículas fágicas, reteniendo las partículas de mayor tamaño. A partir de esta suspensión de fagos purificados se realizó la titulación de bacteriófagos, los experimentos de propagación y la extracción de ADN fágico.

3.4. Titulación de bacteriófagos (ISO 10705-2:2000, 2000)

Mediante la técnica de la doble capa de agar:

- Crecer la cepa huésped en MSB a 37°C en agitación hasta alcanzar la fase crecimiento exponencial ($DO_{600\text{ nm}}$: 0,3-0,5).
- Fundir el medio MSA semisólido (MSAss) y añadir el $CaCl_2$ 1M. Reservar en el baño (previamente calentado a 45°C) hasta su uso.
- Añadir 1 ml de la suspensión de fagos + 1 ml de la cepa huésped (fase exponencial) + 2,5 ml de MSAss en tubos de 10 ml.
- Agitar suavemente y verter sobre una placa de MSA agar. Distribuirlo homogéneamente a lo largo de toda la placa y dejar enfriar sobre una superficie fría y llana.
- Realizar también un control de cepa (2,5 ml de MSAss y 1 ml de la cepa huésped), un control del MSAss (2,5 ml de MSAss) y, en caso de haber hecho diluciones, un control del PBS o tampón de fagos (2,5 ml de MSAss y 1 ml del tampón).
- Una vez solidificada la capa de MSAss, se incuban las placas a 37°C durante 18 h.
- Realizar el recuento del número de calvas de lisis observadas por cada placa (UFP/ml).

3.5. Propagación de bacteriófagos en cultivo líquido.

Mezclar en un tubo de 50 ml:

- 1 ml de la suspensión fágica.
- 1 ml *E. coli* WG5 crecida a una DO_{600nm} : 0,3-0,5.
- 8 ml de caldo LB.

El volumen final de 10 ml se homogenizó y se incubó a 37°C en agitación durante 18 h. Tras la incubación, se centrifugó el cultivo a 4000 x *g* durante 15 min y el sobrenadante se filtró por filtros PES de baja adsorción proteica de 0,22 µm (Millex-GP, Merck-Millipore).

3.6. Extracción ADN fágico para análisis de GRAs por qPCR (modificado de Sambrook & Russel, 2001)

A partir de 0,5 ml de muestra:

- Tratamiento con cloroformo: añadir 50 µl de cloroformo (1/10; v/v). Agitar en vórtex durante 2 minutos y centrifugar a 16000 x *g* durante 5 minutos. Recuperar el sobrenadante.
- Tratamiento con ADNasa: Añadir 20 µl de ADNasa (10mg/ml) e incubar a 37°C durante 1 hora. Después del tratamiento, inactivar la ADNasa a 75°C durante 5 minutos. Coger una alícuota (20 µl) y conservarla a -20°C. Esta alícuota se utilizará posteriormente como control de la eficiencia de la eliminación de ADN no encapsidado (ausencia de ADN bacteriano libre en el medio).
- Tratamiento con proteinasa K: Añadir 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 250 µl de tampón de proteinasa K. Incubar a 55°C durante 1 hora.
- Mezclar la muestra en proporción 1:1 (v/v) con fenol/cloroformo (1:1; v/v) en tubos de Phase Lock Gel™ de 2 ml (VWR Internacional) y centrifugar a 16000 x *g* durante 5 minutos.
- Añadir cloroformo (1:1; v/v) y centrifugar de nuevo a 16000 x *g* durante 5 minutos. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa).
- Precipitar el ADN fágico añadiendo 100 µl de acetato de sódico 3M y 1,5 ml de etanol absoluto (96-100%). Incubar a -20°C durante 18 h.

- Recuperar el ADN precipitado en tubos de 1,5 ml y centrifugar a 16000 x *g* durante 30 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y lavar el *pellet* con 250 µl de etanol 70%. Centrifugar a 16000 x *g* durante 10 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante cuidadosamente y secar el pellet de ADN a temperatura ambiente durante 30 minutos en una vitrina de extracción de gases.
- Eluir el ADN con 100 µl de H₂O bidestilada estéril y conservarlo a - 20°C hasta su análisis.

3.7. Extracción y purificación de ADN fágico (para secuenciación de viromas)

Dado que para la secuenciación de ADN se requiere una concentración y pureza elevada, se eligió el kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen) para realizar la extracción de ADN fágico, debido a que demostró una mayor eficiencia en la recuperación de ADN viral (con la pureza necesaria) que otros kits. El protocolo seguido fue el proporcionado por la propia casa comercial y se detalla a continuación. Después de tratar las suspensiones fágicas con cloroformo y ADNasa:

- Se parte de un volumen de 140 µl de muestra.
- Añadir 560 µl de buffer AVL (tampón de lisis) sin secuestrador de ARN. Agitar con vórtex hasta obtener una mezcla homogénea.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Añadir 560 µl de etanol (96-100%). Agitar con vórtex para homogenizar con la muestra.
- Añadir 630 µl de la mezcla anterior a una columna (Mini columna QIAamp, Qiagen) provista de un tubo de 2 ml y centrifugar a 6000 x *g* durante 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml y descartar el filtrado.
- Repetir el paso anterior las veces necesarias hasta pasar todo el volumen de muestra.
- Añadir 500 µl de buffer AW1 (tampón de lavado) y centrifugar a 6000 x *g* durante 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml y descartar el filtrado.
- Añadir 500 µl de buffer AW2 (tampón de lavado) y centrifugar a 20000 x *g* durante 3 minutos. Descartar el filtrado y colocar la columna en un nuevo tubo de 2 ml. Centrifugar de nuevo a 20000 x *g* para eliminar posibles restos de buffer AW2 en la columna.
- Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga estéril (Eppendorf) y añadir 40 µl de H₂O bidestilada estéril. Centrifugar a 6000 x *g* durante 1 minuto.
- Añadir otros 40 µl de H₂O bidestilada estéril y centrifugar a 6000 x *g* durante 1 minuto.

- El volumen final de ADN viral eluido es de 80 μ l. Almacenar a -80°C hasta su uso.

Este protocolo está estandarizado para un volumen de muestra de 140 μ l, pero se pueden utilizar volúmenes más grandes, de hasta 280 μ l de muestra. Si fuera el caso, sería necesario añadir el doble de buffer AVL y de etanol. No es necesario añadir más volumen de los tampones de lavado (AW1 y AW2). En nuestro caso, a partir de 1 ml de muestra se realizaron varias extracciones de ADN viral y se juntó todo el volumen obtenido en un tubo de microcentrifuga. El ADN viral obtenido se purificó y concentró utilizando el kit comercial DNA Clean & Concentrator®-5 (Zymo Research) siguiendo el protocolo proporcionado por la propia casa comercial que se detalla a continuación:

- Añadir 400 μ l de muestra y 800 μ l de DNA binding buffer (tampón secuestrador de ADN) a un tubo de microcentrifuga (Eppendorf). Agitar con vórtex hasta obtener una mezcla homogénea.
- Añadir todo el contenido de la mezcla a una columna (Columna Zymo-Spin™, Zymo Research) provista de un tubo de 2 ml. Centrifugar a 16000 x *g* durante 30 segundos. Pasar la columna a un nuevo tubo de 2 ml y descartar el filtrado.
- Añadir a la columna 200 μ l de DNA wash buffer (tampón de lavado) y centrifugar a 16000 x *g* durante 30 segundos. Descartar el filtrado y repetir este paso.
- Pasar la columna a un tubo de microcentrifuga estéril y añadir 50 μ l de H₂O bidestilada estéril. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 16000 x *g* durante 30 segundos. El filtrado contiene el ADN viral purificado.

La concentración final de ADN purificado se determinó utilizando el equipo Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen, Thermofisher) utilizando el kit Qubit™ 1X dsDNA HS, siguiendo las indicaciones del fabricante que se detallan a continuación:

- Añadir 190 μ l de la solución de trabajo Qubit™ y 10 μ l de cada estándar (ST1 y ST2) a dos tubos para ensayos Qubit™.
- Añadir 2 μ l de ADN purificado y 198 μ l de la solución de trabajo Qubit™ a un tubo de ensayo para Qubit™. Utilizar un tubo por muestra.
- Agitar todos los tubos con vórtex durante 2-3 segundos.
- Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Realizar una calibración con el ST1 y el ST2. Verificar que el valor del ST2 es al menos 10 veces superior al del ST1 para una correcta calibración.
- Medir la concentración de ADN de las muestras.

3.8. Inducción de partículas fágicas de muestras antárticas

- Filtrar 1 litro de agua antártica mediante filtros Isopore™ de policarbonato de 0,2 µm (Merck-Millipore), quedando las diferentes comunidades microbianas marinas retenidas en el filtro.
- Suspender el filtro en 7 ml de Caldo marino e incubarlo a 18°C durante 48-72 horas y en agitación para enriquecer las comunidades bacterianas de la muestra.
- Añadir mitomicina C a una concentración final de 0,5 µg/ml para inducir el ciclo lítico de los posibles profagos. Incubar a 20°C, sin agitación y oscuridad durante 18 h.
- Purificar la suspensión de fagos inducidos mediante su filtración con filtros PES de baja adsorción proteica de 0,22 µm (Millex-GP, Merck-Millipore).
- Almacenar las suspensiones fágicas a -20°C hasta su análisis.

3.9. Aislamiento y recuperación de virus de aguas antárticas (adaptado de Poulos et al., 2018)

Inicialmente se llevó a cabo una filtración gradual de 5 litros de aguas de mar antárticas, primero utilizando portafiltros Swinnex de 5 µm (Merck-Millipore), seguido de una filtración por filtros MCE (Merck-Millipore) de tamaño de poro de 3 µm y una filtración final por filtros de policarbonato Isopore™ de 0,2 µm (Merck-Millipore). Todos estos pasos de filtración fueron necesarios para eliminar las partículas de mayor tamaño y obtener un filtrado en el que predominaran las partículas virales.

Debido a que la concentración viral en aguas de mar en ocasiones es muy baja, a partir del filtrado obtenido se realizó una concentración de las partículas virales utilizando una técnica basada en una floculación química, seguida de una filtración y resuspensión. La técnica empleada se detalla a continuación:

- Precipitar las partículas virales del filtrado añadiendo 250 µl de la solución de FeCl₃ (10g/L). Esta solución actúa como un agente floculante que se une a las partículas virales de la muestra.
- Agitar durante 1 minuto.
- Añadir otros 250 µl de la solución de FeCl₃ (10g/L) y agitar. Esperar 1 hora para que precipiten todas las partículas virales.
- Filtrar por filtros Isopore™ (Merck-Millipore) de 1,2 µm, permitiendo que las partículas virales que han floculado quedan retenidas en el filtro.

- Recuperar el filtro.
- Resuspender el filtro en 5 ml de tampón 0.1M EDTA-0.2M MgCl₂-0.2M ácido ascórbico (pH 6-6,5). Dejar a 4°C, en agitación y en oscuridad durante 18 h.
- Recuperar todo el volumen de tampón, donde quedan suspendidas las partículas virales.
- Dializar la muestra (3.11).
- Concentrar la suspensión viral hasta un volumen final de 0,5 ml utilizando unidades de ultrafiltración Amicon® (Merck-Millipore).

3.10. Precipitación de bacteriófagos de aguas de mar Mediterráneo con Polietilenglicol (PEG)

A partir de 100 ml de agua de mar Mediterráneo filtrada por filtros PES de baja adsorción proteica de 0,22 µm (Merck-Millipore):

- Añadir 5,84 g de NaCl a la suspensión de fagos. Disolver manualmente y pasar todo el contenido a botellas de centrifuga.
- Dejar en hielo 1 hora para que precipiten restos celulares.
- Centrifugar a 11000 x *g* durante 10 minutos a 4°C.
- Pasar el sobrenadante a una nueva botella de centrifuga.
- Añadir 10 g de PEG 8000. Disolver manualmente y dejarlo a 4°C durante 18 h.
- Centrifugar a 11000 x *g* durante 30 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante. Eliminar resto de sobrenadante con micropipeta. Poner la botella boca abajo durante 5 minutos.
- Resuspender el pellet con 1 ml de tampón de fagos. Si hay más de una botella de centrifuga, pasar el contenido de una botella a otra hasta suspender todos los pellets y recuperar el máximo posible de fagos.
- Dializar la muestra (3.11).
- Concentrar la suspensión viral hasta un volumen final de 0,5 ml utilizando unidades de ultrafiltración Amicon® (Merck-Millipore).

3.11. Diálisis de suspensiones fágicas de aguas de mar

- Añadir el volumen de la suspensión fágica a una membrana de diálisis. Para evitar la pérdida de muestra, la membrana debe sellarse con unas pinzas de diálisis.
- Introducir la membrana de diálisis en 1,5 L de tampón de diálisis y dejar en agitación durante 1 hora.
- Cambiar el tampón de diálisis por tampón fresco y dejar en agitación durante 18 h.
- Recuperar el volumen de muestra dializado.

3.12. Tratamiento de las membranas de diálisis

- Cortar unas 25 tiras de membrana de diálisis (MWCO - 12-14000 Da) (Medicell Membranes Ltd).
- Hervir 10 minutos en tampón de lavado.
- Lavar con H₂O destilada.
- Hervir 10 minutos en tampón EDTA.
- Conservar a 4°C en tampón EDTA.

3.13. Filtración por membranas para eliminar bacteriófagos en muestras clínicas

- Añadir 20 ml de muestra (orina/líquido ascítico) a un tubo de centrifuga de 50 ml. Adicionar la cepa huésped (*E. coli* WG5/ *P. aeruginosa* PA14) y sus respectivos bacteriófagos a una concentración final de 10² UFC/ml y de 10⁵ UFP/ml, respectivamente.
- Agitar con vórtex durante 5 minutos.
- Dividir el contenido en dos tubos de centrifuga de 50 ml. Reservar uno de los tubos.
- Filtrar todo el contenido de uno de los tubos por filtros de fluoruro de polivinilideno o PVDF (Durapore®) de tamaño de poro de 0,45 µm, que permiten retener las partículas más grandes (bacterias) y el paso de las más pequeñas (fagos).
- Lavar el filtro con 10 ml de PBS y volver a filtrar. Repetir este paso.
- Recuperar el filtro y añadirlo a un tubo de centrifuga con 10 ml de PBS y 10ml de caldo LB 2X (doble concentrado). Añadir 10 ml de caldo LB 2X al tubo con la muestra sin filtrar.
- Agitar ambos tubos en vórtex durante 5 minutos.

- Sembrar una alícuota de cada tubo o diluciones seriadas sobre placas de agar LB para el recuento bacteriano.
- Paralelamente, utilizar una alícuota de cada tubo para realizar también una titulación de bacteriófagos (más detallado en el apartado 3.4).
- Incubar las placas y ambos tubos a 37°C durante 18 h. Lo tubos incubarlos en agitación.
- Realizar el recuento bacteriano y fágico para verificar que la filtración no afecta al recuento bacteriano y que se ha reducido el número de fagos presentes inicialmente en la muestra filtrada (tubo con filtro).

3.14. Preparación de muestras de fagos para microscopía electrónica

- Usar rejillas de cobre/níquel de 200 mesh recubiertas con una película de formvar al 5% con recubrimiento de carbón.
- Irradiar las rejillas durante 5 minutos con luz ultravioleta para facilitar una mejor extensión de la muestra sobre la rejilla.
- Depositar sobre la cara limpia de un trozo de Parafilm®, 10 µl de la muestra, 3 gotas (10 µl cada una) de H₂O bidestilada estéril y 1 gota (10 µl) de molibdato de amonio al 2% (p/v) a pH 7,0.
- Contactar la rejilla con la muestra por la parte donde se encuentra la membrana de formvar durante 1 minuto.
- Lavar la rejilla pasándola sobre las 3 gotas de H₂O bidestilada estéril durante un tiempo total de 1 minuto (20 segundos por gota).
- Poner la rejilla en contacto con el agente de tinción (Molibdato de amonio al 2% pH: 7) durante 2 minutos. Eliminar el exceso de líquido con ayuda de un trozo de papel de filtro.
- Dejar secar la rejilla sobre papel filtro dentro de una placa de Petri a temperatura ambiente (dejando un tiempo mínimo necesario para el secado completo de la rejilla antes de observar la rejilla en el microscopio electrónico).
- Observar la preparación en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (JEOL) operando a 100 kv entre 60000-150000 X.

8.4. Anexo 4: Reacciones de qPCR

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica derivada de la PCR convencional que permite cuantificar de forma absoluta o relativa el número de copias genómicas (CG) de un gen determinado presente en una muestra. En el caso de las reacciones con sondas de hidrólisis fluorescentes, la técnica permite la detección y cuantificación del gen diana de forma específica mediante la hidrólisis de las sondas. En la presente tesis, se utilizaron mayoritariamente sondas TaqMan® MGB (*Minor Groove Binder*) marcadas con FAM (fluorocromo) y NFQ (*Non Fluorescent Quencher*). Este método se basa en la actividad exonucleasa 5' - 3' de la enzima Taq polimerasa, que degrada las sondas durante la extensión de la nueva hebra, permitiendo la liberación del fluorocromo. La Taq polimerasa añade nucleótidos al cebador y extiende la nueva hebra hacia las sondas de doble marcaje. Cuando la Taq polimerasa se encuentra con la sonda, la acción exonucleasa de la Taq polimerasa activa la sonda, y tras completar la síntesis de la nueva hebra, la sonda se degrada y se libera el fluorocromo, lo que genera la emisión de fluorescencia. La liberación de fluorocromos y la cantidad de productos de PCR generados son proporcionales, permitiendo la cuantificación del gen diana.

Para el diseño de cebadores y sondas se buscaron las secuencias de las variantes de cada gen en la base de datos GenBank (NCBI). Es importante que la secuencia de los cebadores y la sonda se encuentren en una región del ADN lo suficientemente conservada. Utilizando el programa Bioedit (v.7.2) se alinearon las secuencias para conseguir una secuencia consenso, y a partir de ésta se utilizó el programa Primer Express v3.0.1 (Applied Biosystems) para obtener el diseño final de cebadores y sondas, siguiendo las recomendaciones del fabricante:

- La secuencia diana deber tener un tamaño entre 50 y 150 pb.
- El tamaño de la sonda debe ser mayor al de los cebadores, siendo la T_m de los cebadores entre 58-60°C y la de la sonda entre 68-70°C.
- Evitar que hayan más de tres repeticiones de una base en los cebadores, sobre todo que no hayan más de 3 guaninas (G) o citosinas (C) en los extremos 3'.
- Impedir que haya 3 guaninas juntas o la combinación GA (guanina-adenina) en el extremo 5'.

4.1. Condiciones generales

Reactivo	Volumen (µl)
TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems)	10
Cebadores (UP y LP) y sonda TaqMan® (customizado)	1
ADN	9
Volumen final	20

Para la detección y cuantificación del gen *16S ARNr* se llevó a cabo la reacción de qPCR mediante el uso de SYBR™ Green, un colorante fluorescente de unión de ADN bicatenario que permite la detección del producto de PCR que se genera y acumula durante la reacción. La unión del SYBR™ Green al ADN produce un cambio estructural en la molécula del colorante, emitiendo la fluorescencia, que aumenta con la acumulación del producto de PCR. La detección de la fluorescencia permite la cuantificación del gen diana. En este caso, la reacción de qPCR utilizada fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (µl)
Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)	25
Cebadores (UP y LP)	5 + 5
ADN	10
H ₂ O bidestilada estéril	5
Volumen final	50

La qPCR se llevó a cabo utilizando el equipo StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems). La concentración inicial de la TaqMan® Environmental Master Mix y de la Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) era 2X y la de la mezcla de cebadores y sonda 20X. La concentración final de trabajo fue 1X.

Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes:

- Paso inicial: 50°C/ 2 minutos (1 ciclo)
- Activación: 95°C/ 10 minutos (2 minutos con SYBR™ Green) (1ciclo)
- Desnaturalización: 95°C/ 15 segundos (40 ciclos)
- Elongación: 60°C/ 1 minuto (40 ciclos)

En la amplificación del gen *16S ARNr* fue necesaria la generación de curvas de disociación (*Melting curves*) para detectar una posible amplificación inespecífica que interfiriera con el correcto resultado de la reacción.

4.2. Elaboración de curvas estándar

Para la realización de la cuantificación absoluta, los valores de Ct (*threshold cycle* o ciclo umbral) obtenidos se han de referenciar a una curva estándar. Las curvas estándares de qPCR se elaboraron a partir de gBlocks™ Gene fragments (Integrated DNA Technologies), que consisten en fragmentos de ADN de doble cadena diseñados industrialmente para una fácil construcción y modificación genética. A partir de una secuencia conservada con el gen de interés, entre 125-300 pb de longitud, se obtuvo un liofilizado de esa secuencia de concentración conocida, en nuestro caso de 500 ng de liofilizado.

El liofilizado se reconstituyó en 50 µl de H₂O bidestilada estéril libre de nucleasas, obteniéndose una concentración final de ADN de 10 ng/µl. Para elaborar las curvas estándar se hicieron diluciones decimales seriadas en H₂O bidestilada estéril, realizando 3 réplicas por dilución. Finalmente se cuantificaron por qPCR las 3 réplicas en 6 procesos independientes. Las 3 réplicas de la curva estándar se conservaron a -20°C.

El número de copias genómicas (CG) por µl del gBlock™ se calculó asumiendo que 1 pb del ADN tiene una masa molecular media de 660 Da (g/mol). El cálculo se realiza usando la siguiente formula:

$$\text{Copias genómicas}/\mu\text{l de muestra} = \left(\frac{X \text{ (ng}/\mu\text{l)}}{\text{gBlock}^{\text{TM}} \times 660 \times 10^9 \text{ ng/mol}} \right) \times N_A$$

X: concentración final de ADN del gBlock™ (10 ng/µl)

gBlock™: longitud de la secuencia del gBlock™ (pb)

Número de Avogadro (**N_A**): 6,023 x 10²³

Se realizó una amplificación por qPCR de las diluciones seriadas de cada réplica de la curva estándar y se obtuvo un valor de Ct para cada dilución. Con los valores de Ct obtenidos y conociendo el logaritmo del número de copias genómicas de cada gen, se elaboró una recta patrón. El método de pendiente de Ct permitió conocer los siguientes parámetros:

- Eficiencia de la reacción (E): valores aceptables entre 90-110%
- Coeficiente de correlación (R²): superiores a 0,99
- Pendiente de la recta: valores cercanos a -3,3±10%

A partir de las curvas estándar obtenidas, se establecieron los límites de cuantificación y detección para cada uno de los genes de estudio. El límite de cuantificación (LOQ) se estableció como el último valor de Ct cuantificable y consistente entre las diversas réplicas

analizadas, correspondiente a la menor concentración de copias genómicas de ADN del gBlock™ detectada. Por otra parte, el límite de detección (LOD) se estableció como el valor de Ct correspondiente a la concentración más baja de ADN (CG) que se pudo detectar, pero que, debido a la inconsistencia de los valores, no se pudo cuantificar.

4.3 Controles de qPCR

La presencia de inhibidores de la reacción de qPCR en las muestras, el deterioro de reactivos, o simplemente un mal funcionamiento de la qPCR hace que en ocasiones no se produzca una amplificación del ADN presente en la muestra. La realización de controles en la qPCR es esencial para validar la precisión del ensayo, debido a que permiten distinguir falsos positivos o falsos negativos de los resultados realmente positivos o negativos.

Los controles incluidos en cada ensayo de qPCR fueron los siguientes:

- **Control negativo de qPCR:** se añadieron todos los reactivos del ensayo, pero en lugar de ADN, se utilizó H₂O bidestilada estéril libre de nucleasas. El resultado esperado debe ser indeterminado o un valor de Ct fuera del límite de cuantificación de cada gen (Ct > 37).
- **Control de eliminación de ADN no encapsidado:** se incluyó en cada ensayo de qPCR para confirmar la eficiencia de los tratamientos de eliminación de ADN no encapsidado (fuera de las cápsides fágicas). Se realizó para cada uno de los GRAs de estudio. Un resultado indeterminado o un valor de Ct fuera de los límites de cuantificación para cada gen (Ct > 37) verificó la eficacia del método.
- **Control positivo de cuantificación:** se incluyeron al menos 4 diluciones de los estándares correspondientes que fueron utilizados como controles positivos de amplificación.

Controles de eficiencia de la eliminación de ADN no encapsidado

El protocolo de extracción de ADN fágico requiere de una serie de controles para asegurar que todo el ADN analizado en los ensayos de qPCR pertenece al localizado en el interior de las cápsides fágicas. Para garantizarlo se realizaron dos tratamientos previos a la ruptura de cápsides:

- Tratamiento con cloroformo: para romper las posibles vesículas de membrana externa presentes en la muestra que puedan contener ADN.
- Tratamiento con ADNasa: para eliminar el ADN libre fuera de las cápsides fágicas.

Tras estos tratamientos, se llevó a cabo una inactivación térmica de la ADNasa para evitar falsos negativos en los resultados, debido a que una incorrecta inactivación de la ADNasa podría degradar los cebadores y las sondas de qPCR.

Para verificar la eficacia de la ADNasa, previa ruptura de cápsides, se llevó a cabo una amplificación del gen *16S ARNr*, elegido por su ubicuidad en una gran diversidad de especies bacterianas y porque se ha propuesto como un control para descartar una contaminación con ADN bacteriano. Un resultado indeterminado o fuera de los límites de cuantificación en la amplificación por qPCR de este gen indicó la eficacia del tratamiento y la ausencia de ADN bacteriano fuera de las cápsides fágicas.

8.5. Anexo 5: Cebadores y sondas de qPCR

Gen	Cebadores y sonda	Secuencia	Amplímero (pb)	LOQ (Ct)	Referencia
<i>bla_{TEM}</i>	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	85	35.2	Lachmayr et al., 2009
	LP	TGCATAATTCTCTTACTGTCATG			
	Sonda	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ			
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	UP	ACCAACGATATCGCGGTGAT	101	37	Colomer-Lluch et al., 2011a
	LP	ACATCGCGACGGCTTTCT			
	Sonda	6FAM-TCGTGCGCCGCTG-MGBNFQ			
<i>bla_{CTX-M-9}</i>	UP	ACCAATGATATTGCGGTGAT	85	35.4	Colomer-Lluch et al., 2011b
	LP	CTGCGTTCTGTTGCGGCT			
	Sonda	6FAM - TCGTGCGCCGCTG- MGBNFQ			
<i>bla_{OXA-48}</i>	UP	CGGTAGCAAAGGAATGGCAA	133	32.4	Brown-Jaque et al., 2018
	LP	TGGTTCGCCCCTTTAAGATT			
	Sonda	6FAM-CGTAGTTGTGCTCTGGA-MGBNFQ			
<i>bla_{VIM}</i>	UP	AATGGTCTCATTGTCCGTGATG	61	33.9	Larrañaga et al., 2018
	LP	TCGCACCCACGCTGTA			
	Sonda	6FAM -TGATGAGTTGCTTTTGATTG- MGBNFQ			
<i>sul1</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	67	34.8	Calero-Cáceres et al., 2014
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT			
	Sonda	6FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ			
<i>mecA</i>	UP	CGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAA	92	33.8	Volkman et al., 2004
	LP	TGGTCTTTCTGCATTCTGGA			
	Sonda	6FAM-AATGACGCTATGATCCCAATCTAACTTCCACA-			
<i>qnrA</i>	UP	AGGATTGCAGTTTCATTGAAAGC	138	31.1	Colomer-Lluch et al., 2014
	LP	TGAACTCTATGCCAAAGCAGTTG			
	Sonda	6FAM-TATGCCGATCTGCGCGA-MGBNFQ			

Anexos

Gen	Cebadores y sonda	Secuencia	Amplímero (pb)	LOQ (Ct)	Referencia
<i>qnrS</i>	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	118	34.6	Colomer-Lluch et al., 2014
	LP	GGCATTGTTGGAACTTGCA			
	Sonda	6FAM-AGTTCATTGAACAGGGTGA-MGBNFQ			
<i>armA</i>	UP	GAAAGAGTCGCAACATTAAATGACTT	94	33.4	Quirós et al., 2014
	LP	GATTGAAGCCACAACCAAATCT			
	Sonda	6FAM-TCAAACATGTCTCATCTATT-MGBNFQ			
<i>tetW</i>	UP	GACGGACACCATGTTTTTGGGA	62	34.8	Blanco-Picazo et al., 2020
	LP	AGGAAGTGACTGCCGCTTGA			
	Sonda	6FAM-AGCGTGGGATTACCA- MGBNFQ			
16S ARNr	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	236		Weisburg et al., 1991
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG			

Referencias de los Anexos

- Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2020). Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean seawater ecosystems. *Microorganisms*, 8(9), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091293>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J. J., Cornejo, T., Hurtado, J. C., Navarro, F., & Muniesa, M. (2018). Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental Science and Technology*, 48(13), 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011b). Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011a). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- ISO 7899-2:2000. (2000). ISO - ISO 7899-2:2000 - Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method. <https://www.iso.org/standard/14854.html>
- ISO 10705-2:2000. (2000). ISO - ISO 10705-2:2000 - Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 2: Enumeration of somatic coliphages. <https://www.iso.org/standard/20127.html>
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., Dirienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific TEM beta-lactamase (*bla_{TEM}*) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203–211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
- Larrañaga, O., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Gómez-Gómez, C., Blanch, A. R., Rodríguez-Rubio, L., & Muniesa, M. (2018). Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environment International*, 115, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.019>

- Poulos, B. T., John, S. G., & Sullivan, M. B. (2018). Iron chloride flocculation of bacteriophages from seawater. *Methods in Molecular Biology*, 1681, 49–57. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7343-9_4
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F., & Muniesa, M. (2014). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 606–609. <https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13>
- Sambrook, J., & W. Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. In Society (Vol. 1, 3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., & Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.199>