



## FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

# ESTUDIO DE INFECCIÓN DE FAGOS DE *ALTEROMONAS* SP. EN MUESTRAS ANUALES CONSECUTIVAS

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2016

**Autor: Sara Carrón Moreno**

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Dr. Francisco Rodríguez Valera

Dra. Ana Belén Martín Cuadrado



## RESUMEN

La relación fago-bacteria constituye una de las interacciones parásito-hospedador más antigua y abundante en la Tierra. Aunque se conocen algunos aspectos de esta interacción, no existen hipótesis que expliquen completamente su complejidad ni cómo evolucionan ambas entidades en los ecosistemas naturales.

El modelo evolutivo "*Kill the winner*" se observa en una de las hipótesis evolutivas más afianzadas, la denominada "*Red Queen dynamics*". Ésta se ha demostrado experimentalmente en el laboratorio forzando la interacción de uno o pocos fagos frente a uno o varios hospedadores. Sin embargo, esta hipótesis es difícilmente aplicable en sistemas complejos como son las comunidades microbianas naturales. Gracias a la metagenómica, sabemos que existe una gran diversidad de procariotas y esta diversidad no ocurre sólo a nivel de número de especies, sino también a nivel intra-especie; es decir, dentro de una misma especie procariota coexisten diferentes cepas (o linajes clonales) que difieren en su genoma. En este marco de biodiversidad, Rodríguez-Valera *et al.* (2009), propusieron la hipótesis de "diversidad constante" ("*Constant Diversity*", CD), la cual aúna los nuevos conocimientos de diversidad genómica con las teorías evolutivas previas. En este modelo ecológico, los fagos (virus de bacterias), juegan un papel esencial en la evolución y en el mantenimiento de la biodiversidad de las comunidades microbianas.

En este trabajo se ha analizado la variación de infección de una población de fagos de la bacteria marina *Alteromonas* sp. en el tiempo. Para ello, se han empleado una colección de 15 aislados de *Alteromonas* sp. y de 24 fagos aislados en el 2014 y 2015 a partir de muestras de agua marina superficial. Tras poner a punto diversas técnicas de infectividad, se realizaron múltiples ensayos de infección cruzada de los fagos y cepas de los diferentes años. Los resultados fueron heterogéneos y mostraron que los fagos de una población parecen no infectar ni mejor ni peor a sus cepas coetáneas. Tampoco existe una infectividad mayor de aquellas cepas recogidas en puntos temporales posteriores. Aunque el número de muestras usadas en este trabajo es pequeño, los resultados indican que la hipótesis de la "*Red Queen*" no se cumple.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Virus	1
1.1.1. Generalidades de los virus de los productos de amplificación	1
1.1.2. Clasificación de los virus	2
1.1.3. Morfología de los virus	3
1.1.4. Metodologías de estudio de virus	4
1.1.5. Bacteriófagos marinos	5
1.2. Variabilidad de los hospedadores de fagos en la naturaleza	5
1.3. Interacción de fagos-hospedador	7
1.4. <i>Alteromonas</i> sp.	9
1.5. Fagos de <i>Alteromonas</i> sp.	11
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Toma de muestras	12
3.2. Medios de cultivo	14
3.3. Obtención de los fagos	14
3.4. Aislamiento de <i>Alteromonas</i> sp.	16
3.4.1. Identificación de <i>Alteromonas</i> sp. mediante PCR	17
3.4.2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación	17
3.4.3. Secuenciación (Sanger) de los productos de PCR	17
3.4.4. Secuenciación de los genomas de <i>Alteromonas</i> sp.	18
3.4.5. ANI: Comparación genómica de los genomas de <i>Alteromonas</i> sp.	18
3.5. Ensayo de infección	18
3.5.1. Método de cruces	18
3.5.2. “Spot test”	19
3.5.3. Método de “lágrimas”	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Aislados de <i>Alteromonas</i> sp. y de Alterofagos	21
4.2. Análisis de similitud de las cepas de <i>Alteromonas</i> sp. 2014 y 2015 (ANI)	22
4.3. Infecciones cruzadas de AM_2014 y AM_2015 con los Alterofagos_2014 y Alterofagos_2015	24
5. DISCUSIÓN	27

6. CONCLUSIONES	30
7. REFERENCIAS	31
8. ANEXOS	34

## ABREVIATURAS

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal

ICTV: Comité internacional de taxonomía de virus

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

MET: Microscopio electrónico de transmisión

HGT: Transferencia horizontal de genes

GI: Islas genómicas

CD: Diversidad constante (*“Constant diversity”*)

Bp: Pares de bases

ANI: Identidad media de nucleótidos

FRV: Francisco Rodríguez Valera

TFG: Trabajo de fin de grado

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Virus

### 1.1.1. Generalidades de los virus

Los virus se conocen desde 1892, cuando el biólogo ruso Dimitri Ivanovski observó que extractos filtrados de plantas enfermas del tabaco (usando filtros que retenían las bacterias), éstos seguían siendo infecciosos. Posteriormente, en 1899 el microbiólogo holandés Martinus Beijerinck continuó el estudio de Ivanovski, e identificó el virus del mosaico del tabaco como el nuevo agente infeccioso. Éste se multiplicaba dentro de las células vivas y lo denominó *contagium vivum fluidum* (“germen viviente soluble”) al no ser capaz de atribuirle una entidad física. Dicha teoría introdujo por primera vez el término “virus”, del latín *virus* toxina o veneno <sup>(1)</sup>. La primera sospecha de que los virus eran capaces de infectar bacterias la aportó el bacteriólogo F. Towrt (1915). Éste, al guardar colonias de micrococos junto con una preparación del virus de la viruela, observó como las colonias morían al volverse vidriosas y transparentes <sup>(2)</sup>. No fue hasta años más tarde, cuando el microbiólogo F. D’Herelle, al observar el mismo proceso de lisis en microbios aislados de enteritis bacteriana, les dio a estas partículas el nombre de “bacteriófagos” (del griego *phagein* que significa comer). Estas observaciones permitieron establecer las primeras interacciones entre estas partículas y las bacterias.

Los virus son entidades físicas producidas por la evolución biológica y genética, que poseen algunas propiedades de los sistemas vivos como tener un genoma y ser capaces de adaptarse a un ambiente cambiante. Actualmente, sabemos que las partículas víricas son acelulares y con un diámetro medio de entre 10- 400 nm. Con una cantidad estimada de  $10^{31}$  virus, son las partículas más ubicuas en la Tierra, y la “virofera”, porción de La Tierra con virus, abarca prácticamente todos los hábitat, desde la atmósfera a las zonas más profundas de los océanos <sup>(3)</sup>.

Los viriones, nombre por el que se conocen las partículas víricas en medio extracelular, no disponen de la información genética necesaria para obtener energía metabólica, siendo incapaces de crecer y dividirse por sí mismos. Por lo tanto, dependen de una célula hospedadora para proliferarse. Hay diferentes tipos de virus dependiendo del organismo al que infecten. En este trabajo nos hemos

centrado en los fagos o bacteriófagos, que son los virus cuyo hospedador es una bacteria o una archaea.

### 1.1.2. Clasificación de los virus

La ausencia de un marcador universal que esté presente en todos los genomas virales y que permita catalogar la diversidad viral de una manera análoga a la aproximación por rRNA para eucariotas y procariotas<sup>(4)</sup>, hace que la clasificación de los virus se produzca por criterios morfológicos o la composición de su genoma. Los virus tienen composición y estructura diversa, y se clasifican atendiendo a distintos criterios en función de su material genético, estructura externa o del tipo de hospedador al que infectan.

Actualmente las dos clasificaciones más usadas son: (i) la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV). Ésta reconoce 4 grupos taxonómicos: orden, familia (subfamilia), género y especie; (ii) la clasificación de Baltimore: 7 grupos de virus atendiendo al tipo de genoma y su mecanismo de replicación. Esta clasificación es compleja ya que el material genético del virus puede estar codificado en forma de ADN o ARN, mono- o bicatenario. Además, en el caso del ARN monocatenario, la cadena puede presentar polaridad positiva o negativa. Por último, la estructura que conforma el material genético también puede variar siendo lineal, circular o segmentada. En las Tablas 1 y 2, se muestra un ejemplo de la clasificación taxonómica de virus realizada por el ICTV en 2015 y los 7 grupos pertenecientes a la clasificación de Baltimore.

<b>Orden:</b> <i>Caudovirale</i>	(3 Familias)
<b>*Familia:</b> <i>Myoviridae</i>	(5 Subfamilias y 28 géneros fuera de las subfamilias)
<b>*Familia:</b> <i>Podoviridae</i>	(2 Subfamilias y 14 géneros fuera de las subfamilias)
<b>**Subfamilia :</b> <i>Picovirinae</i>	(2 Géneros)
<b>**Subfamilia :</b> <i>Autographivirinae</i>	(4 Géneros)
<b>**Genero:</b> <i>N4virus</i>	(1 Especies)
<b>***Especie:</b> <i>Escherichia virus N4</i>	

**Tabla 1:** Ejemplo reducido de la clasificación del Orden *Caudovirales*, centrado en la especie *Escherichia virus N4* del género *N4virus*, según la última clasificación taxonómica del ICTV en 2015 <sup>(5)</sup>.

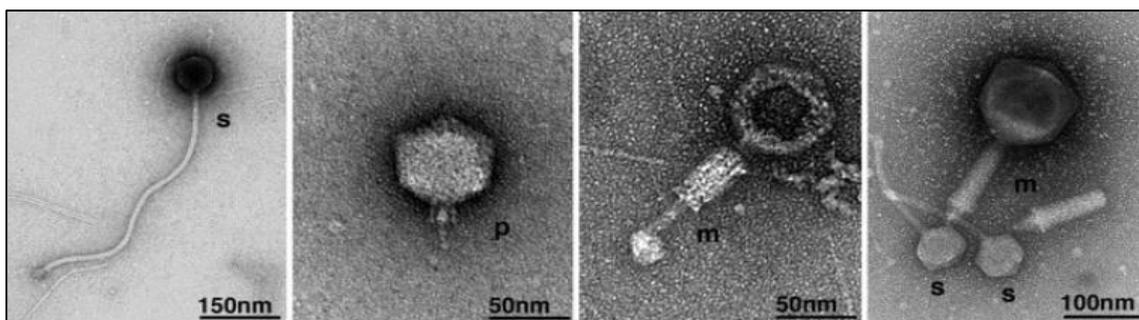
Grupo	Ácido nucleico	Características	Familias
I	dsDNA (ADN bicatenario)	Replicación en el núcleo o citoplasma	<i>Adenoviridae, Herpesviridae, Papovaviridae, Poxviridae</i>
II	ssDNA (ADN monocatenario)	Replicación en el núcleo	<i>Parvoviridae</i>
III	dsRNA (ARN bicatenario)	Segmentación del genoma mARN monocistrónico	Reoviridae
IV	ssRNA(+) (ARN monocatenario con polaridad positiva)	mARN policistrónico o transcripción compleja	<i>Astroviridae, Calciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Togaviridae</i>
V	ssRNA (-) (ARN monocatenario con polaridad negativa)	Requiere ARN polimerasa dependiente de ARN	<i>Arenaviridae, Orbomyxoviridae, Bunyaviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae, Rhadoviridae</i>
VI	ssRNA-RT (ARN monocatenario retrotranscrito)	ARN sirve de molde para la transcripción inversa	<i>Retroviridae</i>
VII	dsDNA-RT (ADN bicatenario retrotranscrito)	Retrotranscripción durante la maduración viral	<i>Hepadnaviridae</i>

**Tabla 2:** Los 7 grupos de las clasificación de Baltimore en función del tipo de genoma y el mecanismo de recombinación <sup>(6)</sup>.

### 1.1.3 Morfología de los virus

Gracias a la mejora de las técnicas microscópicas, se sabe que el tamaño de los bacteriófagos puede comprender entre 24-200 nm. Los viriones presentan una cubierta externa de naturaleza proteica denominada cápside, cuya función consiste en mantener intacto al genoma susceptible a los daños físicos, químicos o enzimáticos que se pueden encontrar en el medio extracelular. Además, presentan las proteínas necesarias para la interacción virus-hospedador. Algunos virus de eucariotas, pueden preservar la envoltura lipídica de la célula hospedadora tras su extracción por gemación.

Las subunidades proteicas que conforman la cápside pueden adoptar dos tipos de simetría muy diferenciadas: (i) una simetría simple helicoidal, la cual aporta una estructura cilíndrica con cierta flexibilidad, y (ii) una más compleja, la simetría icosaédrica, que forma una estructura hueca cuasi-esférica con 20 caras. El 96% de los bacteriófagos presentan una cola hueca unida a la cápside y forman parte del orden *Caudovirales* <sup>(7)</sup>. En función de la morfología de la cola, se pueden clasificar en tres familias (Figura 1), *Podoviridae* de cola corta, *Myoviridae* con cola larga y contráctil, o *Siphoviridae* con cola larga y flexible. Otras morfologías descritas para los virus son filamentosos, pleomórficos o poliédricos <sup>(8)</sup>.



**Figura 1.** Micrografías de TEM de virus obtenidos en lagos antárticos (9). S: sifovirus, P: podovirus, M: miovirus.

#### 1.1.4. Metodologías de estudio de virus

Desde su descubrimiento, el estudio de las partículas víricas se ha realizado tras su aislamiento en el laboratorio. Este proceso se lleva a cabo por métodos de “ensayo de placa de lisis o calvas de lisis”, que permiten una observación visible de la interacción entre el bacteriófago y su hospedador. Estos ensayos aportan información tanto cualitativa como cuantitativa de la dinámica de infección en un medio controlado. Es obvio que para llevar a cabo dicha metodología es necesario disponer de un hospedador fácilmente manipulable que no actúe como factor limitante. Gracias a la metagenómica, se sabe que únicamente se han llegado a cultivar una pequeñísima fracción de los microorganismos de la naturaleza (<0.1%) y, además, la mayoría de los que no se han cultivado son justamente los microorganismos más abundantes en determinados hábitats <sup>(10)</sup>. De modo que, por los métodos tradicionales de cultivo y aislamiento, sólo sería posible emplear un pequeño porcentaje de hospedadores para obtener virus mediante cultivo. Las mejoras en el campo de la óptica, como las técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (TEM), han hecho posible la visualización y estudio de las características morfológicas de los virus y bacteriófagos. Además, también permite un análisis cuantitativo de la presencia de partículas virales en las muestras. Otra de las maneras más efectivas de describir la diversidad viral presente en la naturaleza es la caracterización de metagenomas virales o metaviromas <sup>(11)</sup> (estudios *in silico*). Esta técnica nos ofrece una visión del contenido génico de la comunidad de fagos no cultivados, y hace posible determinar la abundancia relativa de las diferentes poblaciones virales <sup>(12)</sup>.

Actualmente todas estas técnicas se encuentran interrelacionadas y nos permiten dar respuestas a problemas biológicos, pudiendo demostrar y caracterizar *in vitro* o *in vivo* aquellas cuestiones que derivan de estudios *in silico*, como es el caso de este proyecto de final de grado.

### **1.1.5 Bacteriófagos marinos**

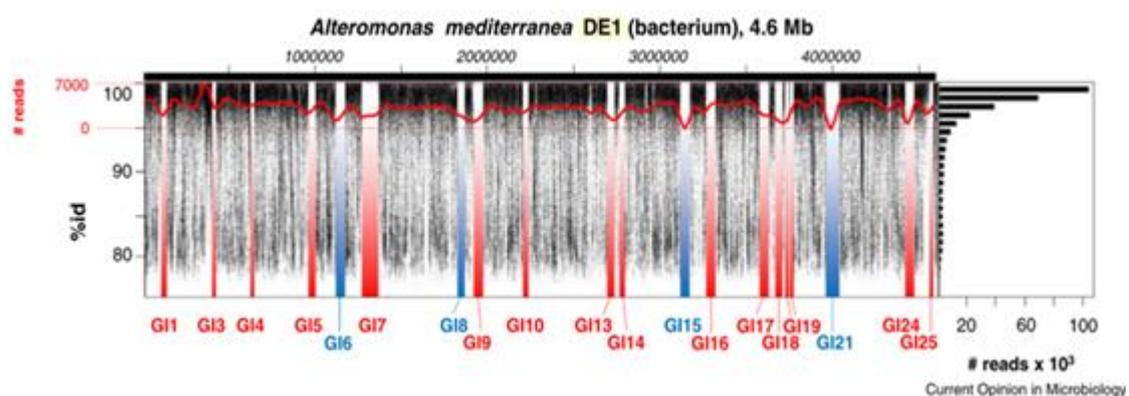
Los primeros indicios de la abundancia de los fagos en el océano se obtuvieron a finales del siglo XX, por medio de determinaciones indirectas de infección con ensayos de placa con bacterias marinas cultivables en el laboratorio. Los resultados indicaban un número de fagos muy por debajo de los existentes en la realidad. El método más empleado para el conteo directo de virus es mediante técnicas microscópicas de fluorescencia o TEM. Se estima que existen unas  $10^7$  partículas víricas por ml de agua <sup>(13)</sup>, que se producen  $10^{23}$  infecciones por segundo en el océano y que hay unas 15 veces más virus que hospedadores (al menos en la zona fótica de los océanos) <sup>(14)</sup>. Por lo tanto, son las partículas biológicas más abundantes en los océanos y constituyen el reservorio de la mayor diversidad genética en el mar. En el entorno marino, los bacteriófagos constituyen una de las piezas fundamentales en el ecosistema ya que provocan la lisis de las células procariotas y, ya que éstas constituyen la mayor biomasa oceánica <sup>(15)</sup>, su muerte libera una gran cantidad de materia orgánica que se integra en los principales ciclos biogeoquímicos.

### **1.2 Variabilidad de los hospedadores de fagos en la Naturaleza**

Los microorganismos se dividen por bipartición creando dos células clones idénticas en cuanto a material genético se refiere. Sin embargo, las células procariotas disponen de la capacidad de incorporar genes externos de otros microbios (cercaos o muy distantes filogenéticamente), mediante fenómenos como “la transferencia horizontal de genes” (HGT). Esto da lugar a un sin fin de combinaciones que, junto a las mutaciones naturales, aportan diversidad a la población bacteriana. Sabemos que en la naturaleza las comunidades microbianas y víricas son muy complejas y que co-existen varios clones de una misma especie procariota que difieren en su contenido génico <sup>(16)</sup>. Para definir el genoma característico de una especie microbiana se acuñó en el 2005 el término de “pan-

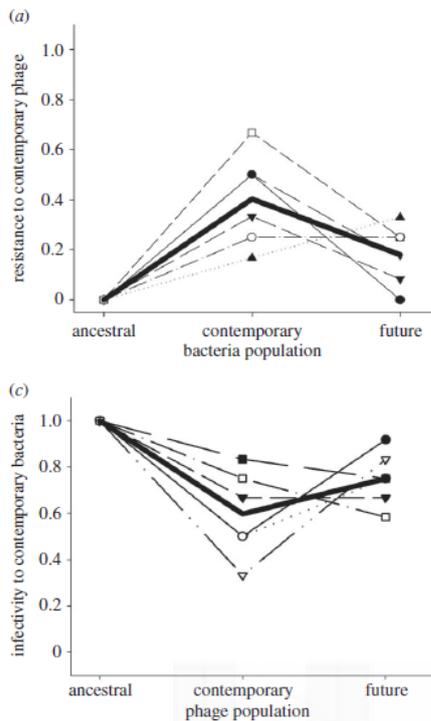
genoma”: conjunto de todos los genes propios de una especie. Éste se puede dividir en dos partes, (i) “core-genoma”: genes presentes en todas las cepas de la especie microbiana y, (ii) “genoma-flexible”, el cual se encuentra solo en algunas cepas (o linajes clonales) de la especie <sup>(17)</sup>.

Este hecho se puede ver en la Figura 2, donde se muestra un reclutamiento del genoma de la bacteria marina *Alteromonas mediterranea* DE1 en un metagenoma marino donde ésta es abundante <sup>(18)</sup>. Un metagenoma está formado por millones de secuencias cortas de ADN (100 nucleótidos (bp)) obtenidas directamente de una muestra natural tras ser secuenciada. Por lo tanto, en éste se encuentra representada la información genética de la comunidad procariota existente en el momento del muestreo. En este tipo de gráficos, se representa cada una de las lecturas del metagenoma por un punto situado a una identidad determinada (eje y) en la región del genoma de referencia donde encuentra la mayor similitud (eje x). Aquellas lecturas que son totalmente idénticas (100%) al genoma de *A. mediterranea* DE1 indican que el organismo se encuentra presente en la muestra. El resto de lecturas indican la gran diversidad que existe en la misma especie (hasta el 95% identidad) e incluso género (80% identidad). En sombreado rojo y azul se indican las zonas del genoma que carecen de secuencias ambientales semejantes. Estas zonas se denominan “islas genómicas” (GI) y es donde se agrupa la mayor parte del genoma flexible. Los genes que se encuentran en estas áreas del genoma, por tanto, pertenecen a un linaje clonal específico, en este caso, de la cepa DE1. Es de especial interés en este trabajo el hecho de que muchos genes presentes en estas islas metagenómicas son posibles dianas de reconocimiento de fagos. En el caso de *A. mediterranea* DE1, la IG3, que codifica genes para la cadena “O” del lipo-polisacárido de la envuelta externa <sup>(19)</sup>.



**Figura 2:** Reclutamiento de *A. mediterranea* DE1 frente a un metagenoma marino <sup>(18)</sup>.

### 1.3. Interacción virus-hospedador

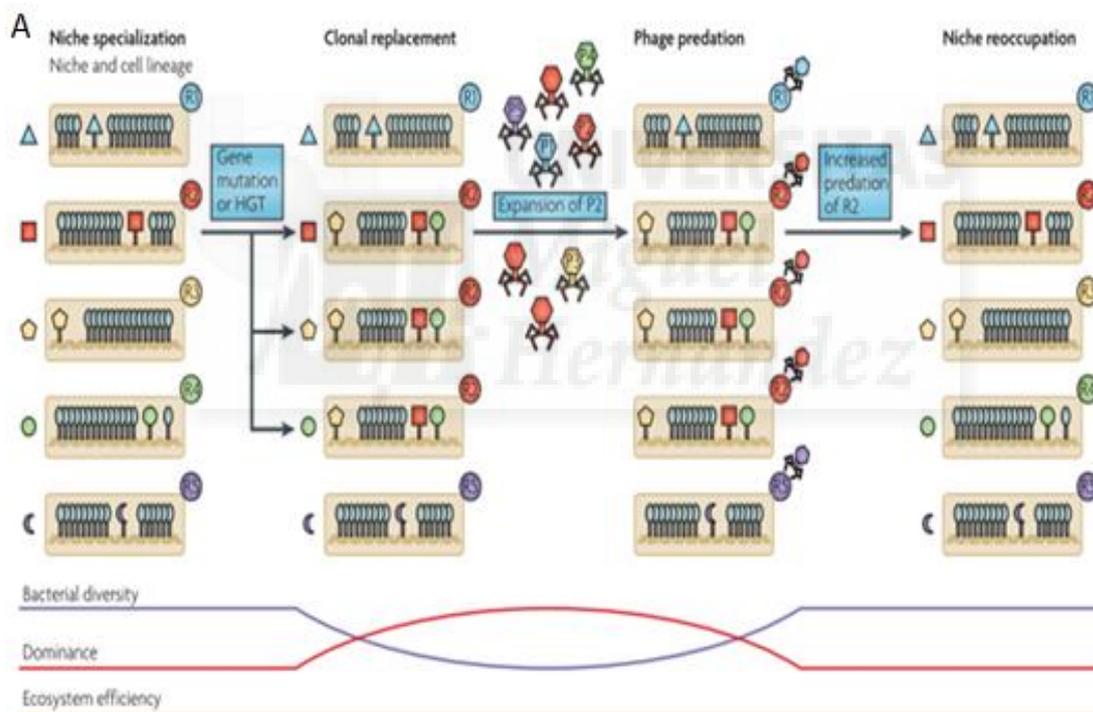


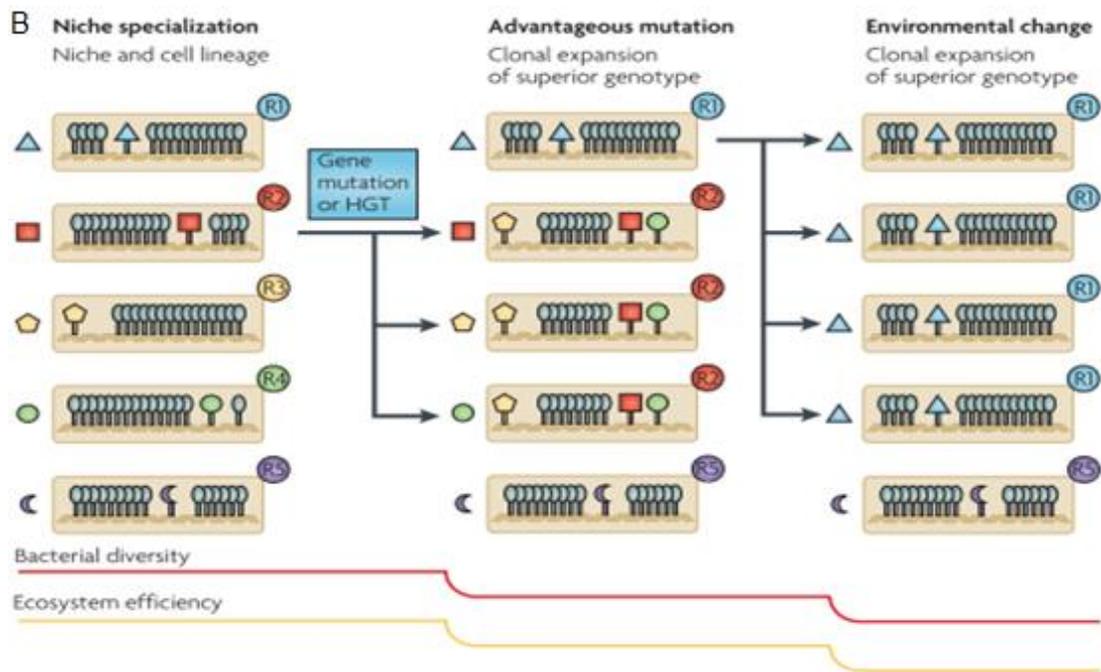
**Figure 3.** Dinámica de la evolución de la infectividad de *P. fluorescens* SBW25 y el fago SBW25φ2.

Los procariontes y sus virus (fagos) han evolucionado juntos desde hace millones de años y las relaciones fago-hospedador son complejas debido a la gran diversidad intra-especie y la propia complejidad de las comunidades microbianas. Existen diferentes teorías intentando explicar la mecánica evolutiva que permite la supervivencia de ambos.

(1) Una de las hipótesis evolutivas más establecidas actualmente es la de la “Red Queen”, ideada inicialmente para explicar la relación hospedador-presa de animales superiores. Ésta también se ha extrapolado al mundo microbiano y, en ella, el hospedador se ve forzado a mutar para evitar ser reconocido por el virus. A su vez, éste ha de mutar para poder reconocer al hospedador. Estos cambios, por tanto, han de verse reflejados en su genoma. Asociado a esta hipótesis se encuentra el modelo “kill-the-winner”, basado en la regulación de la diversidad de poblaciones mediante la mayor predación por parte de los fagos de la especie de bacteria dominante (habría una alternancia de dominación entre los hospedadores y sus fagos). Algunos aspectos de estas hipótesis han sido comprobados en el laboratorio a partir de la interacción de uno o pocos fagos infectando un tipo de hospedador a lo largo del tiempo <sup>(20)(21)</sup>. Por ejemplo, Gomez *et al.* Mostró la evolución de una población de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 en presencia del fago SBW25φ2 en 14 días en el laboratorio. Los resultados mostraron que *P. fluorescens* es más resistente a fagos simpátricos (mismo momento temporal) que a los alopátricos aislados días anteriores o posteriores (Figura 3) <sup>(22)</sup>. Sin embargo, esta evolución forzada no ocurre en la naturaleza y datos metagenómicos sugieren que esta evolución no es tan rápida y es posible obtener bacterias y fagos muy similares en dos puntos temporales diferentes <sup>(19)(23)</sup>.

(2) Para integrar los modelos evolutivos tradicionales con la nueva riqueza de información genómica y metagenómica, Rodríguez-Valera y colaboradores <sup>(24)</sup> propusieron el modelo de “dinámica de Diversidad Constante” (“*Constant Diversity*” CD), según el cual la diversidad de las poblaciones procariontas se conserva gracias a la presión ejercida por la comunidad de virus. Según la CD, existen varios clones de una misma especie coexistiendo entre sí y, si un clon de una especie procarionta de la población adquiere una ventaja sobre el resto y prolifera más, los fagos que lo reconozcan le infectarán y también serán más abundantes, devolviendo así a su hospedador a la situación inicial (Figura 4). De esta manera, se evita así la dominancia de un clon que, por ejemplo, termine con los recursos naturales de un determinado hábitat.





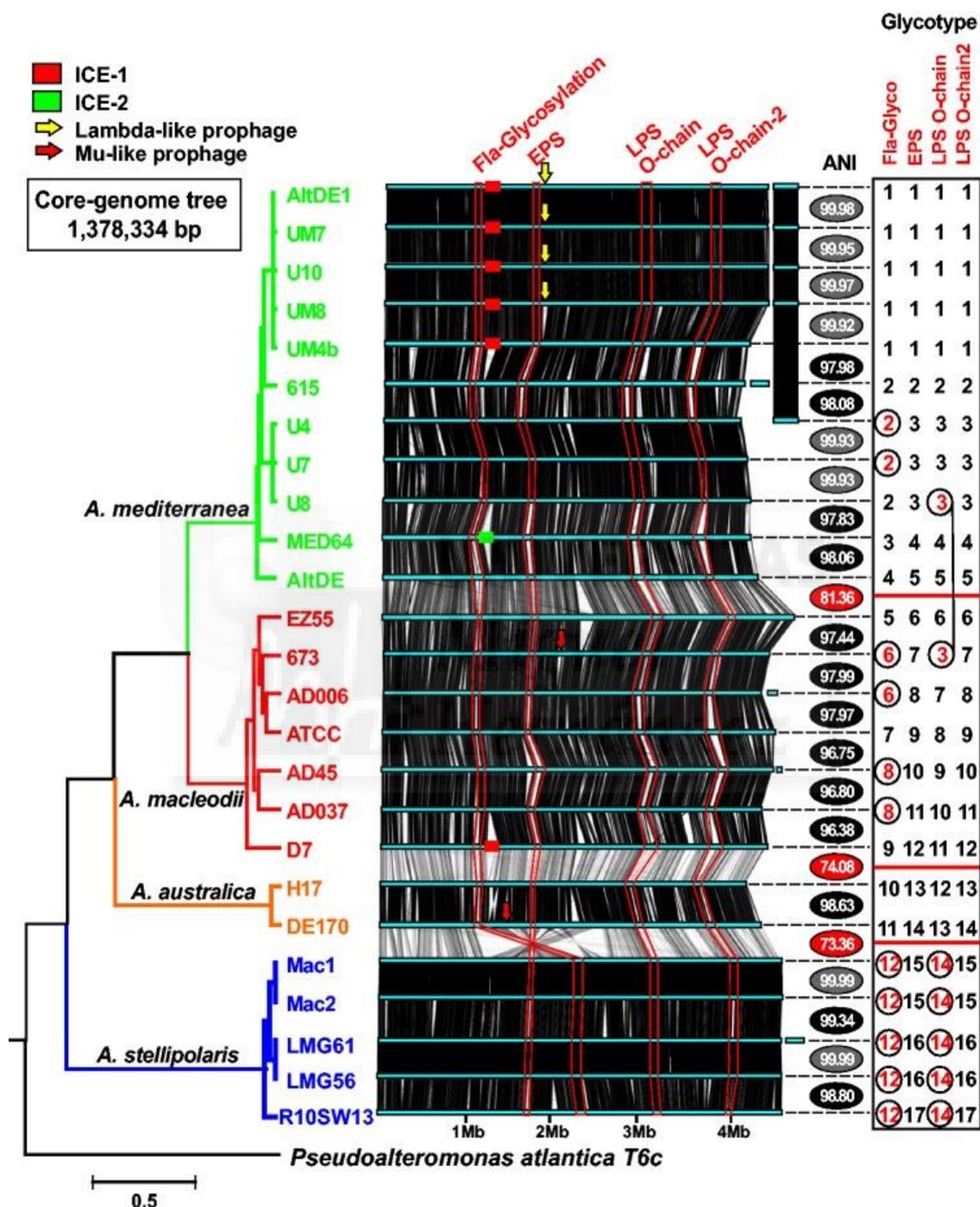
**Figura 4.** Multitud de clones de la misma especie conviven en su propio nicho junto a sus depredadores selectivos (los fagos). Cuando se produce una mutación o una transferencia genómica horizontal (TGH), puede suponer una dominancia de dichas bacterias y por tanto una disminución de la diversidad en el medio. Se produce un barrido selectivo o “clonal-sweep” (B). Sin embargo, esto no ocurre debido a que dicha alteración se verá subsanada por un aumento de los fagos de dichas bacterias, disminuyendo la concentración de la bacteria a valores previos. De esta manera, la diversidad presente en el ambiente permanece constante e inalterable con el tiempo(A)<sup>(24)</sup>.

#### 1.4 *Alteromonas* sp.

*Alteromonas* sp. se ha usado como organismo modelo durante muchos años en el laboratorio de FRV por su rápido crecimiento y su facilidad para ser aislado en cultivo puro. Tiene un tiempo de duplicación de aprox. 24 horas a 25°C y pueden crecer en porcentajes de salinidad amplios, del 1% al 18%, con un crecimiento óptimo al 3% <sup>(26)</sup>. Dentro de este género, podemos encontrar varias especies. En este trabajo se utilizaron dos de ellas, *A. mediterranea* y *A. macleodii*. Existen al menos más de cien aislados en estos momentos y muchas de estas cepas están ya secuenciadas o en proceso de secuenciación <sup>(27)</sup>.

Las especies *A. mediterranea* y *A. macleodii* comparten una identidad media de nucleótidos (ANI) de menos del 84%, mientras que, dentro de una misma especie, por ejemplo, entre las cepas *A. mediterranea* DE y DE1, la semejanza es del

98,51% ANI. A pesar de este valor tan alto, se observan diferencias en las GI (Figura 5)<sup>(28)</sup>.



**Figura 5.** En esta imagen se puede observar a la izquierda, el árbol filogenómico con las distintas especies de *Alteromonas*. A continuación del árbol se observan los genomas de dichas especies alineados de forma fácilmente comparable, lo que permite observar las GI marcadas con líneas rojas. Mas a la derecha, se encuentra una fila vertical, con los ANI, perteneciente a cada especie (21).

## 1.5 Fagos de *Alteromonas* sp.

Los primeros aislamientos de fagos de *Alteromonas* sp. se llevaron a cabo en el 2013 a partir de muestras de aguas procedentes de una piscifactoría en Altea, Alicante (España). Se consiguieron aislar 4 “Alterofagos” empleando como hospedador la cepa *A. macleodii* AD45, los cuales se nombraron AltAD45-P1 a P4 (29).

	AltAD45_P1		AltAD45_P2		AltAD45_P3		AltAD45_P4	
	EOP*	A(%)*	EOP*	A(%)*	EOP*	A(%)*	EOP*	A(%)*
AD45	1	91,2±0,6	1	89,4±14,3	1	84,4±2,5	1	76,3±8,9
AltDE	0,618	85,3±9,1	0,728	94,0±0,6	0,708	86,4±35,9	0,649	91,8±5,6
AltDE1	0,243	97,7±9,4	0,321	94,8±1,6	X	X	X	X

**Tabla 3.** En esta tabla se puede observar la diferencia de infección que presentan los fagos AltAD45-P1, P2, P3 y P4 frente a distintas cepas de *Alteromonas* sp.<sup>(22)</sup>. EOP\*: “*efficiency of plating*” (eficiencia de número de placas de lisis tomando como referencia AD45) y A\*, porcentaje de absorción. *A. macleodii* (AD45), *A. mediterranea* (DE y DE1).

Estos fagos muestran una morfología *Podoviridae*, cápsides icosaédricas isomorfas de cerca de 60-70 nm de diámetro y con una cola muy corta. La secuenciación del genoma de estos fagos mostró muy poca diferencia entre ellos, similitud >99%. Sin embargo, presentaban ciertas diferencias en el contenido genético y no todos presentaban el mismo rango de infección. En la Tabla 3 se observan las diferencias de infección de los AltAD45-P1/P4 frente a tres cepas de *Alteromonas* (2 *A. mediterranea* y 1 *A. macleodii*).

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo de fin de grado son:

- (1) Obtener Alterofagos que infecten la bacteria marina *Alteromonas macleodii* AD45 a partir de muestras marinas recogidas durante los meses de verano del 2014 y 2015.
- (2) Puesta a punto de una metodología que permita el análisis de múltiples infecciones fago-bacteria de una manera lógica en cuanto a tiempo y recursos materiales se refiere.

(3) Llevar a cabo ensayos de infección cruzada de cepas de *Alteromonas* sp. y Alterofagos procedentes de los dos puntos temporales, 2014 y del 2015. Comprobar qué teoría evolutiva se adapta mejor a los resultados obtenidos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Toma de muestras

Desde el año 2013, en el laboratorio de FRV se aíslan de manera rutinaria durante los meses de verano tanto cepas de *Alteromonas* sp. como de fagos que infectan a las mismas. Las zonas de muestreo son cercanas entre sí (Figura 6) y pertenecen a distintas áreas geográficas de la costa alicantina (Villajoyosa, Albufereta, Santa Pola, Campello, San Juan de Alicante, Elche (playa de Arenales) y puerto de Alicante (Regatas). La cepa usada como hospedador es *A. macleodii* AD45, ya que es fácilmente infectable debido, muy probablemente, a que carece de profagos insertados en su genoma <sup>(26)</sup>. Esta cepa fue aislada previamente en el 2003 en el mar Balear. Las otras dos cepas usadas en todos los ensayos de infección fueron DE y DE1, aisladas de muestras de 1000 m de profundidad del mar Adriático también en el 2003. El objetivo global de estas muestras, junto con otras del laboratorio de FRV, es llevar a cabo un estudio evolutivo del tándem Alterofago-*Alteromonas* sp. en un margen temporal amplio. Este trabajo se centra únicamente en dos años, 2014 y 2015, temporadas en los que participé como estudiante en prácticas en su laboratorio.

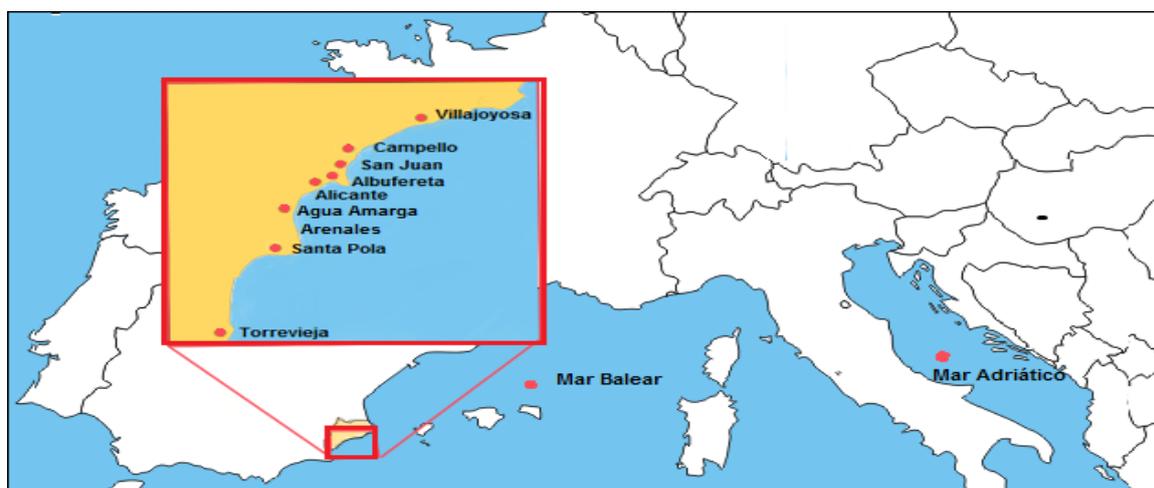


Figura 6. Mapa de la localización de la toma de muestras.

**Campaña 2014.** Se recogieron durante los meses de julio y agosto muestras de agua (50 ml) directamente de la superficie de diferentes playas de la zona levantina en la provincia de Alicante (España) (Figura 6). Se aislaron un total de 108 colonias, 15 de ellas fueron identificadas como *Alteromonas* sp. y fueron secuenciadas. De esta colección, se seleccionaron 7 al azar para este TFG (Tabla 4).

**Campaña 2015.** Se procedió de forma semejante a la campaña del 2014. Se obtuvieron un total de 256 aislados. De manera similar, se seleccionaron 8 cepas de *Alteromonas* sp., 5 de las cuales se encuentran secuenciadas. En la Tabla 5 se encuentran las cepas y fagos usados en este trabajo procedentes de la campaña del 2015.

2014					
<i>Alteromonas</i> sp.			Bacteriofagos		
1	SP35AMe_2014	Santa Pola	1	R3FA_2014	Regatas (Alicante)
2	SP39AMe_2014	Santa Pola	2	R4FA_2014	Regatas (Alicante)
3	A42AMe_2014	Arenales	3	R7FA_2014	Regatas (Alicante)
4	A43AMe_2014	Arenales	4	R24FA_2014	Regatas (Alicante)
5	C48AMe_2014	Campello	5	A45FA_2014	Arenales
6	C49AMe_2014	Campello	6	A53FA_2014	Arenales
7	R58AMe_2014	Regatas (Alicante)	7	A55FA_2014	Arenales
			8	A60FA_2014	Arenales
			9	C76FA_2014	Campello
			10	C79FA_2014	Campello

**Tabla 4.** Aislados de Alterofagos y *Alteromonas* sp. de 2014 empleados en este trabajo. Cada color corresponde con una localización, Santa Pola (naranja), Arenales (rosa), Campello (azul) y Regatas, Alicante (verde).

2015					
<i>Alteromonas</i> sp.			Bacteriofagos		
1	V1.1AM_2015	Villajoyosa	1	V2FA_2015	Villajoyosa
2	Al4.1AM_2015	Albufereta	2	V6FA_2015	Villajoyosa
3	V8.5AM_2015	Villajoyosa	3	V12FA_2015	Villajoyosa
4	T12.1AM_2015	Torre Vieja	4	V16FA_2015	Villajoyosa
5	T13.1AM_2015	Torre Vieja	5	V26FA_2015	Villajoyosa
6	Al15.1AM_2015	Albufereta	6	V29FA_2015	Villajoyosa
7	V18.4AM_2015	Villajoyosa	7	V30FA_2015	Villajoyosa
8	A20.1AM_2015	Arenales	8	V47FA_2015	Villajoyosa
			9	V58FA_2015	Villajoyosa
			10	V61FA_2015	Villajoyosa
			11	V63FA_2015	Villajoyosa
			12	V70FA_2015	Villajoyosa
			13	V73FA_2015	Villajoyosa
			14	V83FA_2015	Villajoyosa

**Tabla 5.** Aislados de fagos y *Alteromonas* sp. recogidos durante 2015 y empleados en este trabajo. Cada color corresponde con la localización de la muestra, Villajoyosa (azul), Albufereta (amarillo), Torre Vieja (rojo) y Arenales (rosa).

### 3.2. Medios de cultivo

**Aislamiento de *Alteromonas sp.*** Se usó medio marino a distintos porcentajes de salinidad, 3.5% y 12% de sal marina: sal marina (Sigma), 0.5% extracto de levadura (PanReac AppliChem) y 0.1 % peptona de caseína (PanReac AppliChem). Cuando fue necesario medio sólido, se añadió 1.5% de agar bacteriológico (Scharlau) al medio anterior. Estos medios fueron autoclavados previamente a su uso. Para el mantenimiento de las células bacterianas durante periodos prolongados de tiempo, se prepararon viales con cultivos de la cepa de *Alteromonas sp.* de 2 ml de medio marino líquido al 3% en 16% de glicerol y se mantuvieron a -80°C.

**Aislamiento de Alterofagos.** Se usó medio marino semisólido (“soft-agar”): 3.5% sal marina, 0.7% agar bacteriológico, 0.5% extracto de levadura y 0.1% peptona de caseína. Para el mantenimiento de la colección de fagos durante periodos prolongados de tiempo: (i) se prepararon stocks concentrados de fagos en tubos falcon de 50 ml en medio marino con 200 µl de cloroformo y se mantuvieron a 4°C y (ii) se prepararon crioviales con 2 ml de este stock de fagos añadiendo glicerol al 50% de concentración final. Se conservaron a -80°C.

### 3.3. Obtención de los Alterofagos

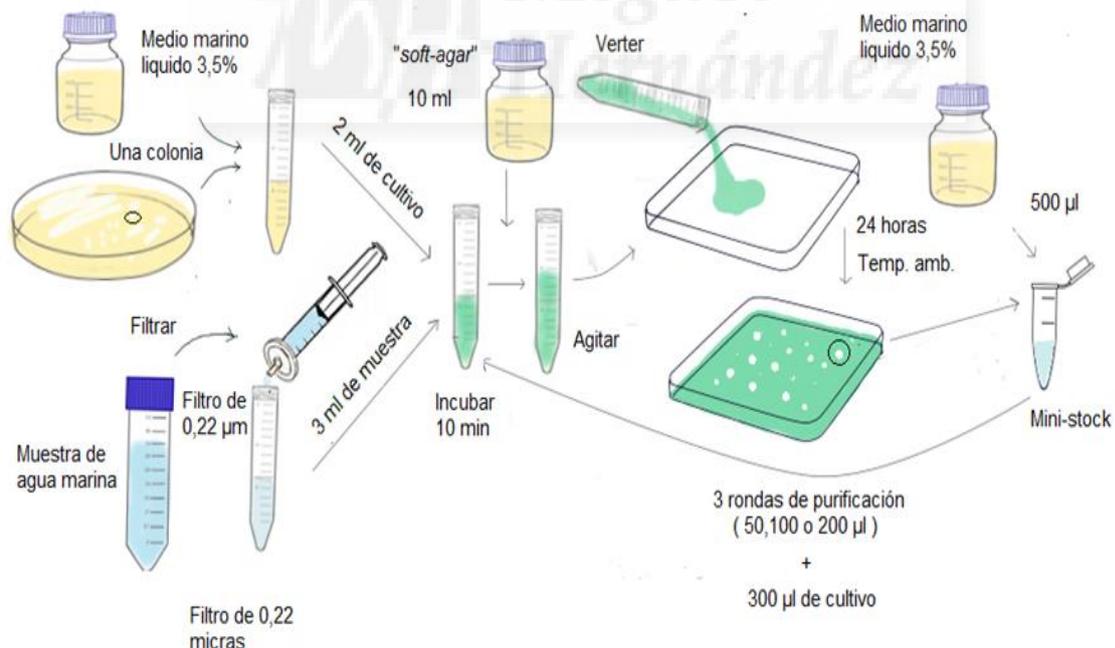
Tal como se comentó anteriormente, para aislar Alterofagos se usó la cepa *A. macleodii* AD45 como hospedador. Para ello, se inoculó una colonia de AD45 en 5-10 ml de medio marino y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad bajo agitación suave y constante (toda la noche). Al día siguiente, la concentración de células es suficiente para realizar las infecciones.

La muestra marina (50 ml de agua de mar) se mantuvo a 4°C hasta su procesado (no más de una/dos horas desde su recogida). 5 ml de esta agua se ha de separar previamente para aislar nuevas cepas de *Alteromonas sp.*. Mediante filtración con jeringuilla y filtro de 0.22 micras, se eliminaron todas las partículas biológicas e impurezas de mayor tamaño, quedando únicamente los fagos en el filtrado.

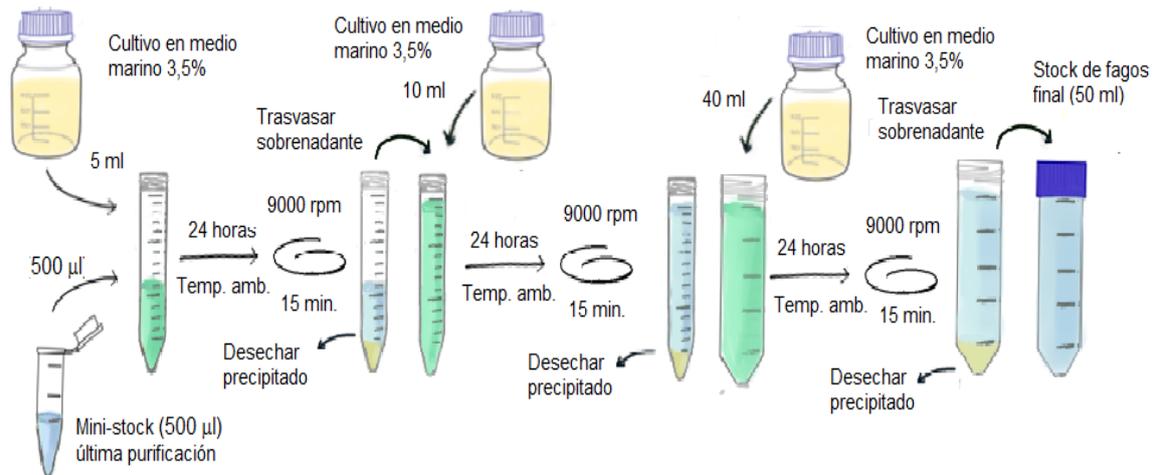
**Proceso de infección** (Figura 7): se mezcló 2 ml del cultivo líquido de células de AD45 con 3 ml de la muestra de agua marina filtrada (que contiene los bacteriófagos). La mezcla se dejó en reposo durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 10 ml de “soft-agar” líquido (precalentado a 40°C), se agitó suavemente y se vertió sobre una placa cuadrada de 13x13 cm. Pasadas 24 h se

observaron halos de lisis definidos en la capa de medio. Con la ayuda de una punta de pipeta, se recogió el agar de los halos de lisis y se depositó en 500  $\mu$ l de medio marino líquido, obteniendo así un mini-stock de fago de partida.

Para asegurar que cada halo de lisis procedía de un fago aislado, se realizaron tres rondas de purificación, repitiendo el proceso anteriormente descrito, pero usando 300  $\mu$ l de células de AD45 y 50, 100 o 200  $\mu$ l del “mini-stock” previo. Para obtener una mayor cantidad de los fagos aislados (Figura 8), se partió de los “mini-stocks” de la última ronda de purificación (500  $\mu$ l) y se mezclaron con 5 ml de células *A. macleodii* AD45 creciendo en medio marino líquido. La mezcla se incubó en un agitador a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min, desechando el precipitado de células y conservando el sobrenadante que contiene los fagos. Este sobrenadante se usó para inocular de nuevo cultivos frescos de células de AD45, primero de 10 ml y después de 40 ml, obteniendo un volumen final aproximado de 50 ml. Estos “stocks” se filtraron con filtros de 0.22  $\mu$ m y se conservaron a 4°C hasta su posterior uso en los ensayos de infección.



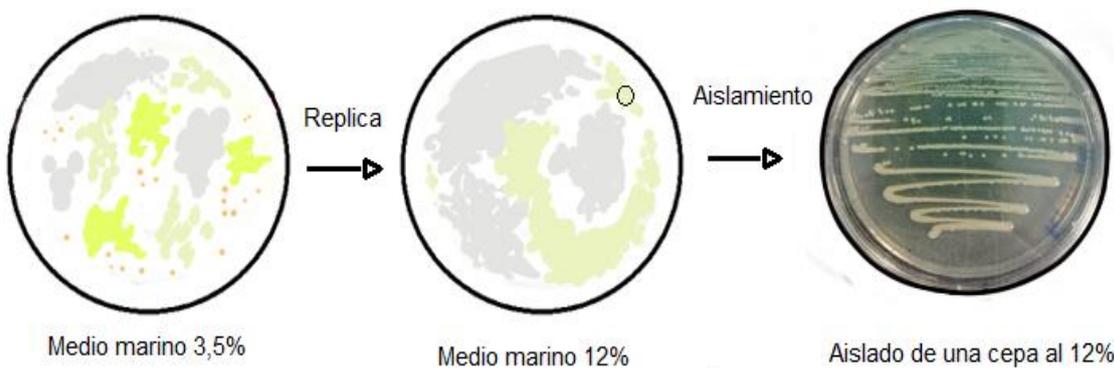
**Figura 7.** Esquema del método de infección para el aislamiento de fagos directos de las muestras de mar.



**Figura 8.** Modelo esquemático de la metodología empleada para aumentar el volumen del stock de fagos.

### 3.4. Aislamiento de *Alteromonas* sp.

Para aislar las cepas de *Alteromonas* sp., se sembraron 200 µl de agua marina en placas Petri con una base de medio marino al 3.5% de sal. Cuando se observó el crecimiento de biomasa, se realizaron réplicas de las mismas en medio marino al 12% de sal. El número de microbios marinos tolerantes a esta alta salinidad es bajo, de manera que aumentamos la probabilidad de aislar *Alteromonas* sp. (Figura 9). Se seleccionaron las colonias con distinta morfología y se aislaron a temperatura ambiente en medio marino al 12% de sal.



**Figura 9.** Imagen del proceso de obtención de cepas aisladas a partir de muestras con una gran diversidad de biomasa.

### 3.4.1. Identificación de *Alteromonas* sp. mediante PCR

Se procedió a realizar varias PCR para verificar que las colonias aisladas correspondían a *Alteromonas* sp. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando la "Taq DNA polimerasa" (Stab Vida®, Portugal). Los cebadores empleados fueron:

- Amplificación del gen *gyrB* (Girasa B): Los cebadores usados permiten discernir las especies *A. macleodii* y *A. mediterránea* de otras especies de Alteromonadales <sup>(30)</sup>.

GyrB-F: 5' AAGCTTATCTTTAGTCTGTGAG-3'

GyrB-R: 5'-TAGGTGTATCAGTAGTAAACGC-3'

- Se realizó una segunda PCR, con el mismo kit y programa de amplificación, utilizando los cebadores específicos para el gen 16S-rRNA:

Ant1: 5'-AATGGCTGTCGTCAGCTCGT-3'

S: 5'-GGGTTTCCCCATTCGGAAATC-3'

El programa de amplificación empleado en ambas PCR fue: (1) 2 minutos a 94°C, (2) 35 ciclos consistentes en desnaturalización durante 5 segundos a 94°C, seguido de hibridación 30 segundos a 56°C y 1 minuto de extensión a 72°C 1 min (3) extensión final durante 5 minutos a 72°C.

### 3.4.2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación

Una vez obtenidos los productos de amplificación por PCR, se procedió a su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1% (p/v) en tampón TAE 1x. Para la aproximación al tamaño del amplicón se utilizó el marcador de peso molecular de 10 Kb (Invitrogen). Finalizada la electroforesis, el DNA de los geles se visualizó bajo la luz ultra violeta mediante tinción de bromuro de etidio y posterior lavado en tampón TAE 1x.

### 3.4.3. Secuenciación (Sanger) de los productos de PCR

Los productos de PCR positivos para los genes *gyrB* y el 16S-rRNA se mandaron secuenciar respectivamente. Posteriormente, se comparó su secuencia mediante BLAST <sup>(31)</sup> con la de la base de datos Genbank (NCBI) para comprobar si realmente se trataba de *A. macleodii* o *A. mediterranea*.

#### **3.4.4. Secuenciación de los genomas de *Alteromonas* sp.**

Fuera del contexto de este TFG, se extrajo el ADN de las cepas identificadas por PCR como *Alteromonas* sp. y se mandó a secuenciar usando la tecnología Illumina (HiSeq2500). Los genomas fueron ensamblados en el laboratorio de FRV. La nomenclatura usada fue AM\_2014 y AM\_2015 para las cepas obtenidas en cada año.

#### **3.4.5. ANI: Comparación genómica de los genomas de *Alteromonas* sp.**

Una vez ensamblado los genomas AM\_2014 y AM\_2015, estos se compararon entre sí y con los genomas de las cepas control AD45, DE y DE1. La comparación se basa en el programa BLASTN usando los parámetros indicados por Goris J *et al.* (1997)<sup>(32)</sup>.

### **3.5. Ensayos de infección**

Para llevar a cabo los objetivos de este trabajo fue necesario infectar las cepas de *Alteromonas* sp. del 2014 (7) y 2015 (8) con los Alterofagos del 2014 (10) y 2015 (14). Esto supone un total de 375 infecciones. Ya que los resultados de infección han de ser robustos, éstos se han de hacer mínimo por triplicado (algunos se realizaron más de 3 veces), por lo que finalmente se realizaron más de 1080 infecciones, más los controles correspondientes. Siguiendo el método tradicional de infección de doble capa y usando una placa para cada infección (el empleado para aislar los fagos, punto 3.3), se produce un gran gasto de tiempo y material, por lo que se idearon distintos métodos de infección que hiciesen este análisis múltiple posible.

#### **3.5.1. Método de infección “en cruz”**

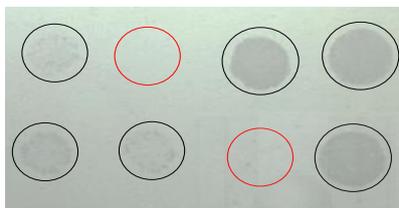
Se partió de placas cuadradas de 13x13 cm con una capa de medio marino al 3,5% de sal, las cuales se dividieron en 16 cuadrantes. En cada cuadrante se realizó una cruz, una diagonal con 100 µl de fago extendido con la propia pipeta y la otra con una colonia de células de *A. macleodii* AD45 proveniente de una placa de cultivo y esparcida mediante un palillo plano de madera. Se dejaron incubar 24 h a temperatura ambiente.

Esta metodología no fue válida ya que en muchas ocasiones el número de fagos en el stock es muy bajo y sería necesario usar un volumen mayor para poder ver la lisis celular de AD45. Además, *Alteromonas* sp., al tener un flagelo, es móvil y las células eran capaces de desplazarse en el pequeño volumen que formaba la cruz, lo que impedía ver los resultados de infección con claridad en numerosas ocasiones.



**Figura 10.** Imagen de un ensayo de infección mediante el método de cruces.

### 3.5.2. “Spot test”



**Figura 11.** Imagen del resultado de un ensayo de infección “spot test”.

Para esta metodología fue necesario preparar placas cuadradas de 13x13 cm con una primera capa de medio marino al 3,5 % de sal.

Se añadió una segunda capa de 10 ml de “soft-agar” mezclado con 200 µl de cultivo líquido de *A. macleodii* AD45. Una vez sólido, se dividió la placa en 16 partes y en cada una se depositaron 100 µl de fago del stock (50 ml) y se dejaron 24 h a temperatura ambiente.

Esta metodología no fue válida ya que en muchas ocasiones el número de fagos en el stock es muy bajo (ver círculos rojos en la Figura 11) y se observan múltiples falso negativos.

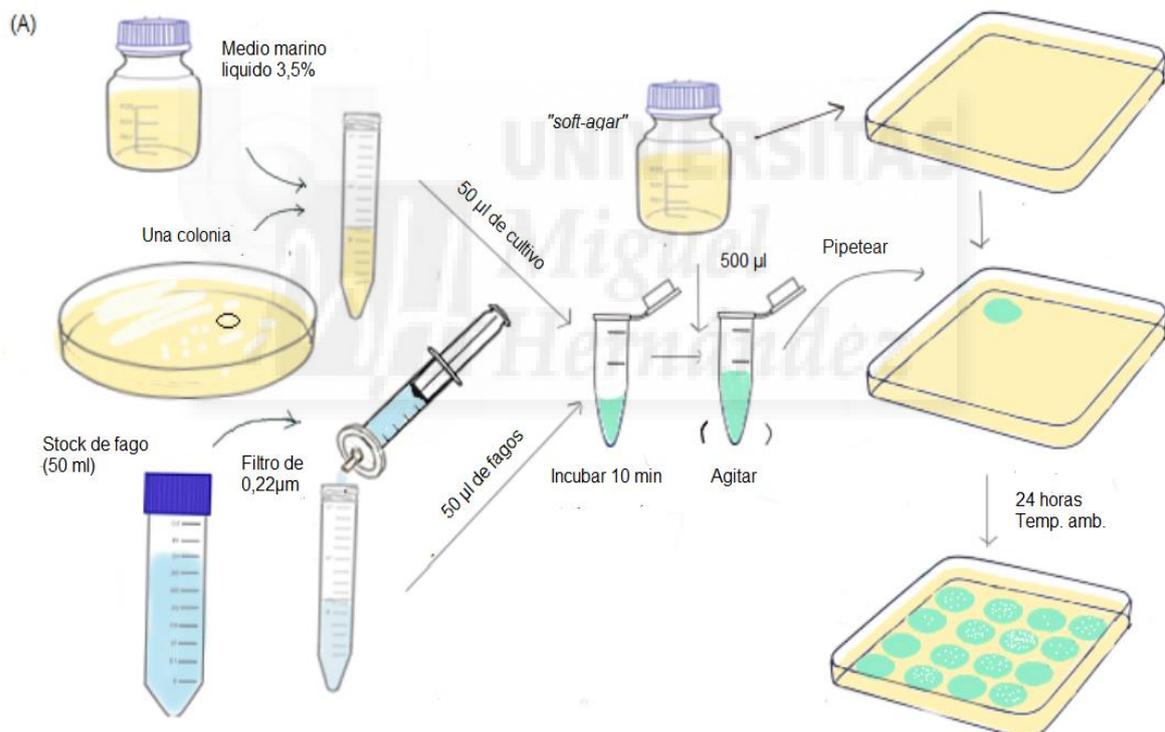
### 3.5.3. Método de “lágrimas”

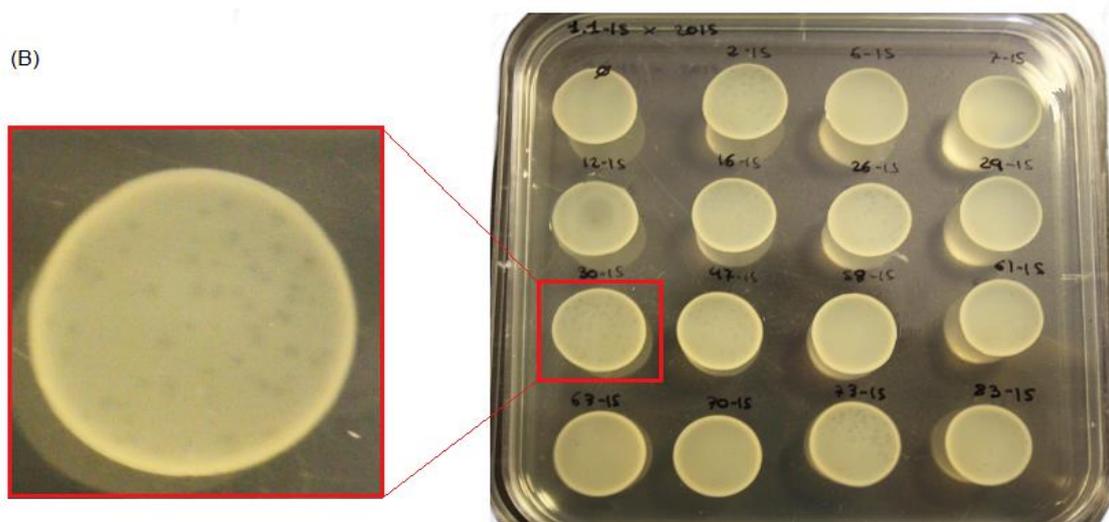
Esta metodología se ideó en este TFG y fue la que finalmente se escogió para proceder al ensayo de infección cruzada con todas las muestras. Está basada en el método de infección por “doble capa” similar al usado en el aislamiento de los fagos (punto 3.3), pero reduciendo las proporciones. Las placas de 13x13 cm se cubrieron con una capa de “soft-agar” y posteriormente se realizó la mezcla de cultivo de células de *Alteromonas* sp. en medio líquido con el stock de fagos (50 ml) previamente filtrado (50 µl:50 µl). Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente se adicionaron 500 µl de “soft-agar” a 40°C. La mezcla se recogió con la pipeta y se depositó cuidadosamente sobre la capa de “soft-agar” de la placa. De

este modo, en cada placa se pueden llevar a cabo 16 infecciones. Éstas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se estudiaba la presencia de halo de lisis en la “lágrima” de agar.

En cada tanda de infección se incluyeron cuatro controles extra: uno formado únicamente con la mezcla de células sin fagos, para asegurar que las células no infectadas crecían correctamente y su lisis no se debía a otros factores y, tres controles más con cepas de *Alteromonas* conocidas: *A. macleodii* AD45, *A. mediterranea* DE y *A. mediterranea* DE1.

Para verificar resultados dudosos, se realizaron infecciones siguiendo la metodología empleada en el aislamiento de fagos (punto 3.3), son 300 µl de cultivo, 200 µl de fagos y 7 ml de “soft-agar” en placas Petri.





**Figura 12.** (A) Modelo esquemático de la metodología de lágrima. (B) Imagen del resultado obtenido con esta metodología.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislados de *Alteromonas sp.* y de Alterofagos

El número total de fagos y de aislados obtenidos a lo largo de las campañas del verano 2014 y 2015 se muestran en la Tabla 6. Durante el 2014, se consiguieron aislar 99 bacteriofagos y 108 colonias que crecían en medio marino salino (ver materiales y métodos). En el 2015, estos números aumentaron a 199 y 256 respectivamente.

2014		2015	
<b>Alterofagos (hospedador: <i>A. macleodii</i> AD45)</b>			
Campello	13	Campello	15
Regatas	44	Torre vieja	8
Agua Amarga	28	Villajoyosa	85
Arenales	14	Arenales	2
<b>Total</b>	<b>99</b>	Albufereta	34
		San Juan	55
		<b>Total</b>	<b>199</b>
<b>Bacterias aisladas</b>			
<b>Total</b>	<b>108</b>	<b>Total</b>	<b>256</b>
<b><i>Alteromonas sp.</i> identificadas</b>			
15		14	

**Tabla 6.** Cantidad de aislados de Alterofagos y *Alteromonas sp.* de las campañas de 2014 y 2015. Los aislados usados en este trabajo provienen de las muestras coloreadas.

Mediante secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR para los genes *gyrB* y 16S-rRNA, se han identificado 15 cepas como *Alteromonas* sp. en el 2014 y 14 en el 2015 (AM\_2014 y AM\_2015). Hasta la fecha se han secuenciado todos los genomas de *Alteromonas* del 2014 y 8 de los obtenidos en el 2015. A lo largo del 2017 y fuera del contexto de este trabajo, se secuenciarán también los fagos obtenidos en este trabajo.

#### **4.2 Análisis de similitud de las cepas de *Alteromonas* sp. 2014 y 2015 (ANI)**

Previo a los resultados de infección, se realizó una comparación genómica de las cepas usadas en este trabajo (Anexo I). Es esperable que si dos cepas son muy similares entre sí, éstas puedan tener unos rangos de infección muy similares. Sin embargo, esto no siempre es así y se sabe que diferencias de tan sólo unos polimorfismos entre dos cepas, pueden dar lugar a diferentes patrones de infección del mismo fago <sup>(33)</sup>.

Los resultados de la comparación genómica mostraron que todas las cepas AM\_2014 son de la especie *A. mediterranea*, con un 97% de identidad con los controles AMeDE1\_2003 y AMeDE\_2003, y tan sólo un 81% con AMAD45\_2003 (especie *A. macleodii*) (Tabla 7). Las cepas SP35AMe\_2014 y SP39AMe\_2014, aisladas de la misma muestra, son 100% idénticas. Se observó que las cepas A42AMe\_2014, A43AMe\_2014 y C49AMe\_2014, al igual que las cepas C48AMe y R58AMe presentaban también una similitud muy alta, a pesar de haber sido aisladas en lugares distintos. Todas las cepas recogidas en 2014 y empleadas en este trabajo tienen entre si una identidad igual o superior del 98%.

	AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	SP35AM_e_2014	SP39AM_e_2014	A42AMe_2014	A43AMe_2014	C49AMe_2014	C48AMe_2014	R58AMe_2014
AMAD45_2003	100	81	81	81	81	81	81	81	81	81
AMeDE1_2003	81	100	98	97	97	97	97	97	97	97
AMeDE_2003	81	98	100	97	97	97	97	97	97	97
SP35AM_e_2014	81	97	97	100	100	98	98	98	99	99
SP39AM_e_2014	81	97	97	100	100	98	98	98	99	99
A42AMe_2014	81	97	97	98	98	100	100	100	98	98
A43AMe_2014	81	97	97	98	98	100	100	100	98	98
C49AMe_2014	81	97	97	98	98	100	100	100	99	99
C48AMe_2014	81	97	97	99	99	98	98	99	100	100
R58AMe_2014	81	97	97	99	99	98	98	99	100	100

**Tabla 7.** Valor del ANI entre las AM\_2014 y los controles AMeDE, AMeDE1 y AMAD45.

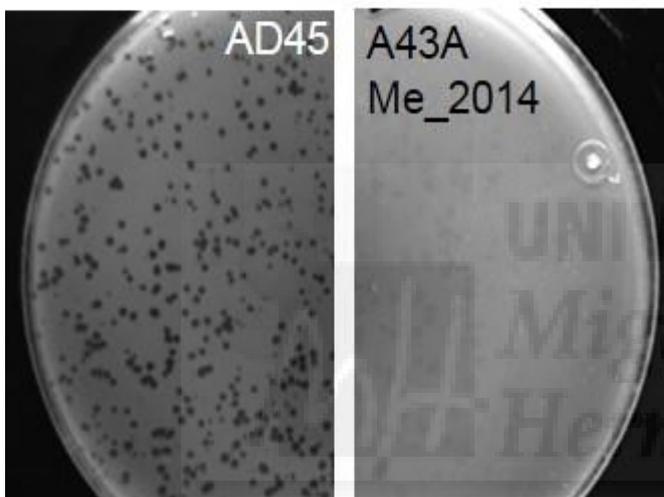
Sólo se han secuenciado 5 de las 8 cepas AM\_2015 seleccionadas para este trabajo (Tabla 8). Al igual que las de 2014, todas ellas pertenecen a la especie *A. mediterranea* (>97% identidad) con una similitud del 81% con respecto a *macleodii*. Las cepas V1.1AM\_2015, V18.4AM\_2015 presentaron una identidad del 100% entre sí y con el control AMeDE\_2003. El resto de cepas, incluyendo AMeDE1\_2003, presentaron una identidad >97%, con excepción de AI15.1AM\_2015, que presentó una identidad menor de 96% con AMeDE\_2003.

	AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	V1.1AMe_2015	V18.4AMe_2015	AI4.1AMe_2015	V8.5AMe_2015	AI15.1AMe_2015
AMAD45_2003	100	81	81	81	81	81	81	81
AMeDE1_2003	81	100	98	98	98	97	97	97
AMeDE_2003	81	98	100	100	100	97	97	96
V1.1AMe_2015	81	98	100	100	100	97	97	97
V18.4AMe_2015	81	98	100	100	100	97	97	97
AI4.1AMe_2015	81	97	97	97	97	100	97	98
V8.5AMe_2015	81	97	97	97	97	97	100	97
AI15.1AMe_2015	81	97	96	97	97	98	97	100

**Tabla 8.** Valor del ANI entre las AM\_2015 y los controles AMeDE, AMeDE1 y AMAD45.

### 4.3 Infecciones cruzadas de AM\_2014 y AM\_2015 con los Alterofagos\_2014 y Alterofagos\_2015

Como se ha comentado en el apartado de Materiales y Métodos, una parte importante de este trabajo fue encontrar una metodología que permitiese analizar la infección de muchas cepas y fagos a la vez ya que suponían más de 1000 ensayos de infección. La metodología del ensayo en “lágrima”, siguiendo la técnica de doble capa, fue la elegida finalmente, realizando 16 infecciones por placa y empleando 4 controles en cada una de las infecciones. Tras varias comprobaciones de viabilidad y reproducibilidad de la técnica, se procedió a realizar las infecciones cruzadas.



**Figure 13.** A la izquierda, placas de lisis de *A. macleodii* AD45 y a la derecha placas de lisis turbias de A43Ame\_2014.

Una de las dificultades añadidas es la heterogeneidad del tipo de placas observadas. Por ejemplo, las placas de lisis en AD45 son grandes y definidas, sin embargo, múltiples cepas presentaban placas de lisis pequeñas o turbias, como las indicadas en la Figura 13. En estos casos, fue necesario realizar el mismo experimento de infección individualmente en

placas Petri para poder ser observadas correctamente y poder realizar un conteo fiable.

Debido a la falta de titulación de los stocks de partida (cada stock tenía un número de fagos diferente) los resultados numéricos son heterogéneos y difíciles de comparar (Anexo II). Por ello, se simplificaron a cuatro tablas cualitativas, indicando únicamente la infección (verde) o la ausencia de ella (rojo).

(1) **AM\_2014 x Alterofagos\_2014.** Los resultados son diversos. Destacan las cepas SP35AMe\_2014 y SP39AMe\_2014 por ser resistentes a todos los fagos y el fago V60FA incapaz de infectar las cepas de AM\_2014 y sí todas las cepas control.

	VAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	SP35AMe_2014	SP39AMe_2014	A42AMe_2014	A43AMe_2014	C49AMe_2014	C48AMe_2014	R58AMe_2014
R3AF_2014										
R4AF_2014										
R7AF_2014										
R24AF_2014										
A45AF_2014										
A53AF_2014										
A55AF_2014										
A60AF_2014										
C76AF_2014										
C79AF_2014										

**Tabla 9.** Resultados de las infecciones AM\_2014 x Alterofagos\_2014

(2) **AM\_2014 x Alterofagos\_2015.** Los resultados indican que las células de las cepas AM\_2014 presentan una alta resistencia a los fagos del 2015, los cuales sí son capaces de infectar a los controles.

	AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	SP35AMe_2014	SP39AMe_2014	A42AMe_2014	A43AMe_2014	C49AMe_2014	C48AMe_2014	R58AMe_2014
V2AF_2015										
V6AF_2015										
V12AF_2015										
V16AF_2015										
V16AF_2015										
V29AF_2015										
V30AF_2015										
V47AF_2015										
V58AF_2015										
V61AF_2015										
V63AF_2015										
V70AF_2015										
V73AF_2015										
V83AF_2015										

**Tabla 10.** Resultados de las infecciones AM\_2014 x Alterofagos\_2015.

(3) **AM\_2015 x Alterofagos\_2015.** En las infecciones de las 8 cepas de AM\_2015 con los fagos aislados en el mismo año, se observan que 4 de ellas, AI4.1AM, V8.5AM, AI15.1AM y T13.1AM, muestran una gran resistencia. El resto, V1.1AM, V18.4AM, A20.1AM y T12.1AM, por el contrario, presentan una alta sensibilidad, al igual que los tres controles

	AMAD 45_200 3	AMeD E1_200 3	AMeD E_200 3	V1.1A Me_20 15	V18.4A Me_201 5	AI4.1A Me_201 5	V8.5A Me_20 15	AI15.1A Me_201 5	T13.1A M_201 5	A20.1A M_201 5	T1.,1A M_201 5
V2AF 2015	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V6AF 2015	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V12A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V16A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V16A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V29A F_201 5	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V30A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V47A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V58A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V61A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V63A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V70A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
V73A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Green	Green
V83A F_201 5	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green

**Tabla 11.** Resultados de las infecciones AM\_2015 x Alterofagos\_2015.

(4) **AM\_2015 x Alterofagos\_2014.** Las cepas V1.1AM, V18.4AM, A20.1AM y T12.1AM, muestran sensibilidad por todos los fagos. Por el contrario, T13.1AM\_2015 es resistente a todos. Las otras cepas muestran sensibilidad media por algunos de los fagos, excepto AI15.1AM\_2015, que solo es sensible a uno de ellos, V79FA\_2014.

	AMAD4 5_2003	AMeDE 1_2003	AMeD E_200 3	V1.1AM e_2015	V18.4A Me_201 5	AI4.1AM e_2015	V8.5AM e_2015	AI15.1A Me_201 5	T13.1A M_2015	A20.1A M_2015	T12.1A M_2015
R3AF_2014	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green
R4AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Red	Green	Green
R7AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
R24AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green
A45AF_2014	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
A53AF_2014	Green	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green	Green
A55AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
A60AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Green
C76AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Green
C79AF_2014	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green

**Tabla 12.** Resultados de las infecciones AM\_2015 x Alterofagos\_2014.

## 5. DISCUSIÓN

En primer lugar, la heterogeneidad de resultados se opone a la idea de “clonal-sweep” (ver Figura 4), donde un único clon (bacteria) sería mayoritario en un determinado hábitat (por tanto, un tipo de fago mayoritario también). Al observar los ensayos de infección en conjunto, se concluye la capacidad de muchos fagos de infectar cepas de *Alteromonas* tanto de 2014 como de 2015. Además, se infectan igualmente los dos tipos de especies de *Alteromonas* sp. con los que trabajamos en este trabajo, *A. macleodii* y *A. mediterránea*. Así, por ejemplo, aunque R3AF\_2014 y A53AF\_2014 son capaces de infectar a *A. macleodii* AD45 y a cepas de *A. mediterranea* (A43Me\_2014 y 1.1AM\_2015), presentan resistencias a los controles *A. mediterranea* DE y DE1. El hecho de que un mismo fago infecte por igual a dos especies diferentes es significativo ya que tradicionalmente se considera que el reconocimiento fago-hospedador es uno de los más específicos de la naturaleza (nivel cepa-serovar). Puede ocurrir que, a pesar de la baja similitud del ANI entre las dos especies, el receptor de estos fagos se encuentre conservado y, por tanto, estos Alterofagos pueden reconocer a ambas. En este aspecto y fuera de este TFG, en el laboratorio de FRV se está realizando un estudio comparativo de los genomas correspondientes para poder identificar putativos genes diana de

estos alterofagos. Algunas de las observaciones a este respecto se exponen a continuación:

**(1) AM\_2014 x Alterofagos\_2014.** Las cepas SP35AMe\_2014 y SP39AMe\_2014 comparten una identidad del 100% y la resistencia a todos los Alterofagos\_2014. Sin embargo, otras cepas con una identidad compartida del 100% (ver tabla 7), a pesar de ser sensible a la mayoría de Alterofagos\_2014 presentan resistencias a algunos fagos de forma independiente. Los Alterofagos\_2014 R3AF y A53AF son incapaces de infectar a los controles AMeDE1 y AMeDE mientras que A60AF\_2014 es capaz de infectar los 3 controles, AMAD45, AMeDE y AMeDE1, pero no las cepas AM\_2014.

**(2) AM\_2014 x Alterofagos\_2015.** Las cepas AM\_2014 presentan resistencia a todos los Alterofagos\_2015, es destacable que sin embargo los controles AMAD45, AMeDE1 y AMeDE con los que presentan una identidad del 81, 97 y 97% respectivamente, son completamente sensibles a estos fagos.

**(3) AM\_2015 x Alterofagos\_2015.** Los Alterofagos\_2015 presentan infectividad frente a la mitad de cepas de 2015 y todos los controles. Infeccionan cepas que comparten una identidad min. del 98% como los controles AMeDE, AMeDE1 y las AM\_2015, V1.1AMe, V18.1AMe, (A20.1AM y T12.1AM también son sensibles a la infección, pero se desconoce su identidad aún). También son capaces de infectar una especie distinta como es el control AMAD45, la cual solo comparte una identidad del 81% con las AM\_2015. Sin embargo, no infectan a AI4.1AMe, V8.5AMe y AI15.1AMe, la cuales son cepas del 2015 con un 97% de identidad con el resto de AM\_2015 y con los controles DE y DE1 (exceptuando AI15.1AMe que presenta un 96% con AMeDE y T13.1AM que también es resistente y no se conoce su identidad). Destaca la resistencia de V1.1AMe\_2015 a V23AF\_2015, cuando la cepa es sensible al resto de fagos y la sensibilidad de A15.1AMe\_2015 a V73FA\_2015 la cual no se ve afectada por ningún otro fago.

**(4) AM\_2015 x Alterofagos\_2014.** Se sigue observando una mayor resistencia en AI4.1AMe, V8.5AMe, AI15.1AMe y T13.1AM, frente al resto de cepas de AM\_2015. Hay una mayor sensibilidad a los Alterofagos\_2014, sobretodo en AI4.1AMe\_2015 y V8.5AMe\_2015. T13.1AM\_2015 sigue presentando una resistencia a todos los

fagos y AI15.1AMe\_2015 únicamente es sensible a V79AF\_2014, el cual es capaz de infectar a todas las cepas de 2015 y los controles. Sería interesante estudiar los genomas de V79AF\_2014 y V73FA\_2015 únicos fagos capaces de infectar a AI15.1AMe\_2015.

Otro hecho destacable es que la cepa V8.5AMe\_2015 presenta una mayor identidad con las cepas de 2014 que con las de su propio año, 98 y 97% respectivamente. Este hecho se aprecia también en las infecciones, presentando una resistencia a todos los fagos de 2015 y una resistencia variable frente a los fagos de 2014 (manteniendo la resistencia a A60FA\_2014), el mismo patrón que presentan las cepas de 2014.

En resumen, no podemos identificar patrones claros de infección de unos fagos frente a unas cepas, ni a la inversa. Estos resultados contradicen algunos de los obtenidos anteriormente en el laboratorio; por ejemplo, Gomez *et al.* (1997) usando *P. fluorescens* como modelo (punto 1.2). En este TFG, al poder disponer de un número más amplio de muestras, tanto de fagos como de hospedadores, observamos diferentes comportamientos. Siguiendo el modelo de la “Red Queen”, la población de *Alteromonas* del 2015 sería una población que habría evolucionado para defenderse de los fagos del 2014; sin embargo, los resultados muestran que estos fagos siguen infectando a muchas de las cepas AM\_2015. De manera paralela, podríamos pensar que los fagos del 2015 habrían evolucionado respecto a los del 2014 y podrían presentar un grado de infectividad mayor a las AM\_2014; pero este hecho tampoco se puede observar en nuestros resultados.

Concluyendo, nuestros resultados indicarían que, en la naturaleza, a nivel de población, no se producen cambios tan rápidos de infectividad y por lo tanto, de evolución. Una posible explicación es que, en realidad, en cada muestreo sólo tenemos una pequeña representación de lo que existe en cada año y que los mismos fagos y cepas bacterianas que existen en el 2014, perduren en el 2015 sin variación alguna. Esta idea encaja más con la idea de biodiversidad explicada por el modelo de “diversidad constante” (CD) propuesto por FRV en el 2009. Para poder corroborar este modelo, sería necesario un estudio mucho más amplio de infección con mayor número de cepas y fagos (con “stock” titulados) que permitan obtener datos cuantitativos. Además, sería necesario disponer del genoma de todos los

fagos y *Alteromonas* sp. empleados, que aportasen la información genética necesaria para comprender por qué se producen variaciones en el rango de infección y tratar de entender, por fin, esta interacción natural.

## 6. CONCLUSIONES

**(1)** La nueva técnica ideada para los ensayos de infección cruzada, el método de “lágrimas”, es un método válido para realizar experimentos de infección múltiple con un número elevado de muestras, permitiendo el contaje del número de halos de lisis (si la concentración de fagos es la adecuada) y deducir por tanto si se ha producido infección o no.

**(2)** La heterogeneidad del valor ANI y la comparación genómica de las cepas de *Alteromonas* sp. secuenciadas hasta la fecha, indicarían que no existe un “clonal-sweep” (no hay un único clon mayoritario) ni en el 2014 ni en el 2015 (en el caso de los fagos, carecemos de su genoma secuenciado para poder hacer esta afirmación).

**(3)** No se observa ningún patrón de infección preferente de las cepas AM\_2014 y AM\_2015 que indique que éstas presenten una mayor resistencia a los fagos con los que cohabitan en un mismo marco temporal, frente a los fagos distantes un año en el tiempo. Aunque se necesitaría una muestra de mayor tamaño, nuestros resultados indicarían que, en un ecosistema diverso como es el océano, la dinámica de evolución “Red Queen” no se cumpliría y que hipótesis como la de “Diversidad Constante” explicarían mejor la heterogeneidad de las infecciones obtenida.

## 7. REFERENCIAS

1. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. Introduction to Modern Virology. Igarss 2014. 2014. 1-5 p.
2. Twort FW. An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. Lancet [Internet]. 1915;186(4814):1241–3. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601203833>
3. Suttle C a. Marine viruses--major players in the global ecosystem. Nat Rev Microbiol. 2007;5(10):801–12.
4. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation . Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. 1995;59(1):143–69.
5. Paez-Espino D, Eloë-Fadrosch EA, Pavlopoulos GA, Thomas AD, Huntemann M, Mikhailova N, et al. Uncovering Earth's virome. Nature [Internet]. 2016;536(7617):425–30. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature19094>
6. Virology Division -IUMS, International Committee on Taxonomy of Virus [Internet]. London, UK: Virus Taxonomy [actualizado en 2016]. Disponible en: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
7. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Lección 2. Clasificación de los virus [Internet]. Disponible en: [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203016/Modulo\\_EXE/leccin\\_2\\_clasificacin\\_de\\_los\\_virus.html](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203016/Modulo_EXE/leccin_2_clasificacin_de_los_virus.html)
8. Ackermann HW, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. Res Microbiol. 2007;158(7):555–66.
9. López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. Science. 2009;326(5954):858–61.
10. Morris RM, Rappé MS, Connon S a, Vergin KL, Siebold W a, Carlson C a, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. Nature. 2002;420(December):806–10.
11. Paul JH, Sullivan MB. Marine phage genomics: What have we learned? Curr Opin Biotechnol. 2005;16(3 SPEC. ISS.):299–307.

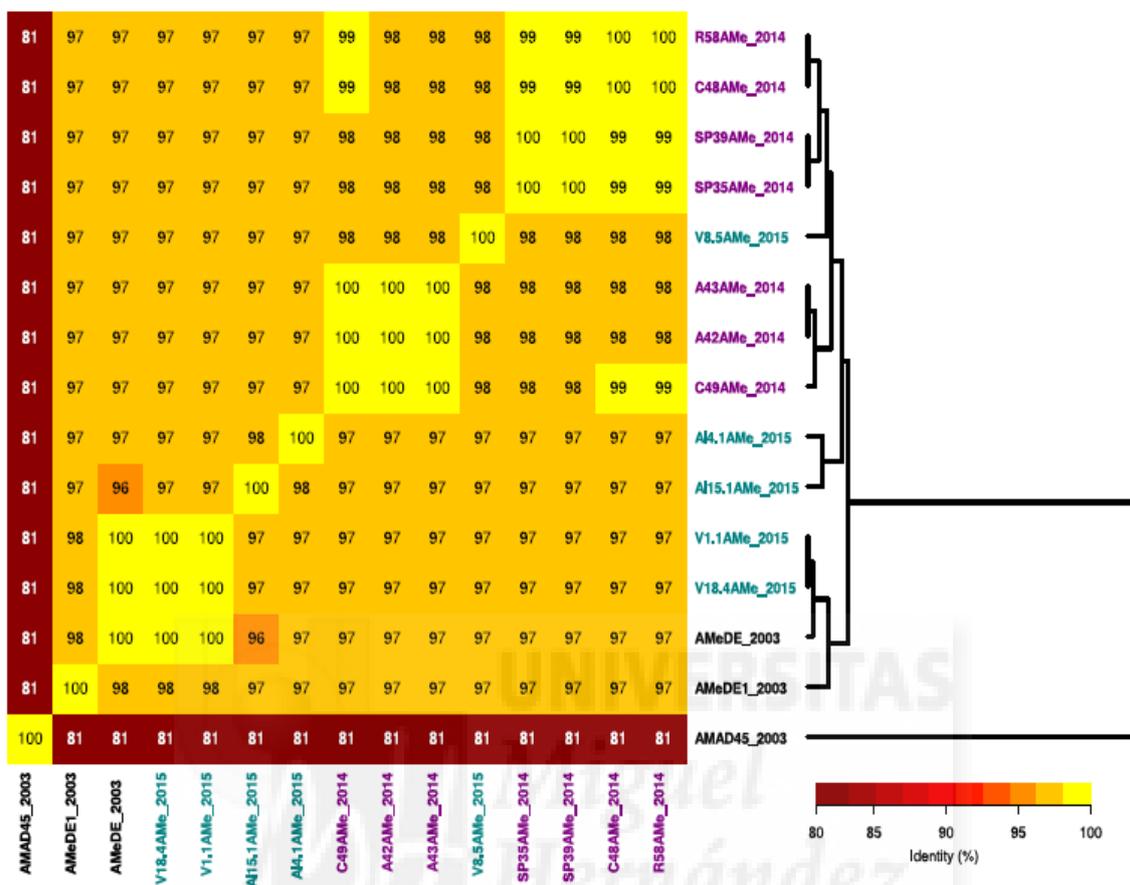
12. Delwart EL. Viral metagenomics. *Rev Med Virol*. 2007;17(2):115–31.
13. Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2000;64(1):69–114. Disponible en : <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Sime-Ngando T. Environmental bacteriophages: Viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol*. 2014;5(JULY):1–14.
15. Fuhrman JA, Cram JA, Needham DM. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015;13(3):133–46. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659323>
16. Kashtan N, Roggensack SE, Rodrigue S, Thompson JW, Biller SJ, Coe A, et al. Single-Cell Genomics Reveals Hundreds of Coexisting Subpopulations in Wild *Prochlorococcus*. *Science* (80- ) [Internet]. 2014;344(6182):416–20. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1248575>
17. Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(6):589–94.
18. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado A-B, López-Pérez M. Flexible genomic islands as drivers of genome evolution. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2016;31:154–60. Disponible en : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527416300339>
19. López-Pérez M, Gonzaga A, Rodriguez-Valera F. Genomic diversity of “deep ecotype” *Alteromonas macleodii* isolates: Evidence for pan-mediterranean clonal frames. *Genome Biol Evol*. 2013;5(6):1220–32.
20. Koskella B. Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host. *Curr Biol* [Internet]. 2013;23(13):1256–60. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.038>
21. Rabajante JF, Tubay JM, Uehara T, Morita S, Ebert D, Yoshimura J. Red Queen dynamics in multi-host and multi-parasite interaction system. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:10004. Disponible en : <http://www.nature.com/srep/2015/150422/srep10004/full/srep10004.html>
22. Gómez P, Ashby B, Buckling A, Gomez P, Ashby B, Buckling A. Population mixing promotes arms race host-parasite coevolution. *Proc R Soc B* [Internet]. 2015;282(1798):20142297. Disponible en : <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1798/20142297.full>

23. Mizuno CM, Rodriguez-Valera F, Kimes NE, Ghai R. Expanding the Marine Virosphere Using Metagenomics. *PLoS Genet.* 2013;9(12).
24. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado A-B, Rodriguez-Brito B, Pasić L, Thingstad TF, Rohwer F, et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009;7(11):828–36. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834481>
25. Ivars-Martinez E, Martin-Cuadrado A-B, D’Auria G, Mira A, Ferriera S, Johnson J, et al. Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. *ISME J* [Internet]. 2008;2(12):1194–212. Disponible en : <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2008.74>
26. López-Pérez M, Gonzaga A, Martin-Cuadrado A-B, Onyshchenko O, Ghavidel A, Ghai R, et al. Genomes of surface isolates of *Alteromonas macleodii*: the life of a widespread marine opportunistic copiotroph. *Sci Rep* [Internet]. 2012;2:696. Disponible en : <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3458243&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
27. Ivanova EP, López-Pérez M, Zabalos M, Nguyen SH, Webb HK, Ryan J, et al. Ecophysiological diversity of a novel member of the genus *Alteromonas*, and description of *Alteromonas mediterranea* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2015;107(1):119–32.
28. López-Pérez M, Rodriguez-Valera F. Pangenome evolution in the marine bacterium *Alteromonas*. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2016;8(5):evw098. Disponible en : <http://gbe.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/gbe/evw098>  
<http://gbe.oxfordjournals.org/content/early/2016/04/29/gbe.evw098.short>
29. Garcia-Heredia I, Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado a.-B. Novel group of podovirus infecting the marine bacterium *Alteromonas macleodii*. *Bacteriophage* [Internet]. 2013;3(2):e24766. Disponible en: <https://www.landesbioscience.com/journals/bacteriophage/article/24766/>
30. López-López A, Bartual SG, Stal L, Onyshchenko O, Rodríguez-Valera F. Genetic analysis of housekeeping genes reveals a deep-sea ecotype of *Alteromonas macleodii* in the Mediterranean Sea. *Environ Microbiol.* 2005;7(5):649–59.

31. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389–402.
32. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(1):81–91.
33. Song J, Xu Y, White S, Miller KWP, Wolinsky M. SNPsFinder - A web-based application for genome-wide discovery of single nucleotide polymorphisms in microbial genomes. *Bioinformatics.* 2005;21(9):2083–4.



## 8. ANEXOS



**Anexo I.** ANI AM\_2014 / AM\_2015. Comparación de la identidad de nucleótidos entre todas las células empleadas en este trabajo de las cuales se conoce la secuencia.

(A)		AMAD45 2003	AMeDE1 2003	AMeDE 2003	SP35AMe 2014	SP39AMe 2014	A42AMe 2014	A43AMe 2014	C49AMe 2014	C48AMe 2014	R58AMe 2014
R3AF_2014	I	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	7			0	0	24	134	300	2	43
	IV	0		0			0	0	0	0	0
R4AF_2014	I	32	0	8	0	0	1	3	0	0	0
	II	6	4	1	0	0	0	0	0	0	0
	III	12			0	0	9	LISIS	52	23	31
	IV	0		0			0	0	0	1	0
R7AF_2014	II	LISIS	12	25	0	0	1	0	1	0	0
	III	19	30	18	0	0	0	0	0	0	0
	IV	LISIS			0	0	24		18	24	21
	I	1		3			25	0	1	0	3
R24AF_2014	II	LISIS	LISIS	130	0	0	0	0	0	0	0
	III	85	104	70	0	0	0	0	0	0	0
	IV	LISIS			0	0	1	0	4	0	5
	II	18		13			28	0	2	0	1
A45AF_2014	III	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0
	IV	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I				0	0	0	10	4	1	0
	II	0		15			43	0	13	3	5
A53AF_2014	III	66	0	0	0	0	2	0	1	0	0
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	11			0	0	0	1	2	1	0
	III	3		0			12	0	13	2	6
A55AF_2014	IV	LISIS	0	13	0	0	0	2	0	0	0
	I	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0
	II	LISIS			0	0	1	2	1	0	1
	III	0		3	0	0	5	33	20	1	1
A60AF_2014	IV		LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0	0
	II	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0
	III				0	0	0	0	0	0	0
	IV	56		48	0	0	0	0	0	0	0
C76AF_2014	I		LISIS	12	0	0	9	18	0	LISIS	25
	II	5	104	12	0	0	LISIS	LISIS	LISIS	15	LISIS
	III				0	0	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS
	IV	19		LISIS			38	LISIS	LISIS	67	21
C79AF_2014	II	34	LISIS	13	0	0	15	51	150	31	3
	III	9	9	10	0	0	14	58	36	41	LISIS
	IV	LSIS			0	0	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS
	I	LISIS		LISIS			35	71	LISIS	14	119

(B)		AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	SP35AMe_2014	SP39AMe_2014	A42AMe_2014	A43AMe_2014	C49AMe_2014	C48AMe_2014	R58AMe_2014
V2AF_2015	1	278	128	244	0	0	0	0	0	0	0
	2	75	54	94	0	0	0	0	0	0	0
	3	105	49	69	0	0	0	0	0	0	0
	4	7		8							
	5	26	48	6			0	0	0	0	0
V6AF_2015	1	212	162	156	0	0	0	0	0	0	0
	2	20	31	23	0	0	0	0	0	0	0
	3	45	30	39	0	0	0	0	0	0	0
	4	9		5							
	5	8		1			0	0	0	0	0
V12AF_2015	1	0	65	112	0	0	0	0	0	0	0
	2	102	49	29	0	0	0	0	0	0	0
	3	37	LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0	0
	4	44		26							
	5	46	132	20			0	0	0	0	0
V16AF_2015	1	LISIS	15	22	0	0	0	0	0	0	0
	2	24	8	8	0	0	0	0	0	0	0
	3	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0		1							
	5	0	3	0			0	0	0	0	0
V16AF_2015	1	3	LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0	0
	2	LISIS	108	140	0	0	0	0	0	0	0
	3	168	LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0	0
	4	8		11							
	5	8	40	0			0	0	0	0	0
V29AF_2015	1	LISIS	42	88	0	0	0	0	0	0	0
	2	105	9	4	0	0	0	0	0	0	0
	3	LISIS	56	32	0	0	0	0	0	0	0
	4	LISIS		LISIS							
	5	29	150	114			0	0	0	0	0
V30AF_2015	1	25	74	127	0	0	0	0	0	0	0
	2	236	32	26	0	0	0	0	0	0	0
	3	31	LISIS	LISIS	0	0	0	0	0	0	0
	4	13		0							
	5	10	55	0			0	0	0	0	0
V47AF_2015	1	LISIS	0	90	0	0	0	0	0	0	0
	2	77	1	29	0	0	0	0	0	0	0
	3	48	0	168	0	0	0	0	0	0	0
	4	10		150							
	5	21	0	0			0	0	0	0	0
V58AF_2015	1	90	18	13	0	0	0	0	0	0	0
	2	23	10	4	0	0	0	0	0	0	0
	3	7	3	17	0	0	0	0	0	0	0
	4	1		0							
	5	5	6	0			0	0	0	0	0
V61AF_2015	1	2	37	77	0	0	0	0	0	0	0
	2	73	25	25	0	0	0	0	0	0	0
	3	21	14	44	0	0	0	0	0	0	0
	4	48		41							
	5	44	80	20			0	0	0	0	0
V63AF_2015	1	59	12	20	0	0	0	0	0	0	0
	2	35	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	5	1	160	0	0	0	0	0	0	0
	4	15		5							
	5	3	22	0			0	0	0	0	0
V70AF_2015	1	128	9	41	0	0	0	0	0	0	0
	2	41	3	8	0	0	0	0	0	0	0
	3	9	29	16	0	0	0	0	0	0	0
	4	3		0							
	5	2	5	0			0	0	0	0	0
V73AF_2015	1	17	6	4	0	0	0	0	0	0	0
	2	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	12	4	0	0	0	0	0	0	0
	4	0		0							
	5	2	3	0			0	0	0	0	0
V83AF_2015	1	1	5	14	0	0	0	0	0	0	0
	2	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	1	8	0	0	0	0	0	0	0
	4	0		0							
	5	2	1	0			0	0	0	0	0

(c)		AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	V1.1AM_e_2015	V18.4AMe_2015	A14.1AMe_2015	V8.5AMe_2015	A15.1AMe_2015	T13.1AM_2015	A20.1AM_2015	T12.1AM_2015
V2AF_2015	1	278	128	244	90	66	0	0	0	0	56	23
	2	75	54	94	64	LISIS	0	0	0	0	64	20
	3	105	49	69	62	42	0	0	0			
	4	7		8								
	5	26	48	6								
V6AF_2015	1	212	162	156	42	29	0	0	0	0	33	4
	2	20	31	23	14	LISIS	0	0	0	0	36	11
	3	45	30	39	14	13	0	0	0			
	4	9		5								
	5	8		1								
V12AF_2015	1	0	65	112	90	27	0	0	0	0	LISIS	32
	2	102	49	29	11	27	0	0	0	0	156	55
	3	37	150	150	111	73	0	0	0			
	4	44		26								
	5	46	132	20								
V16AF_2015	1	150	15	22	24	8	0	0	0	0	1	0
	2	24	8	8	LISIS	5	0	0	0	0	4	1
	3	4	0	4	36	51	0	0	0			
	4	0		1								
	5	0	3	0								
V16AF_2015	1	3	LISIS	LISIS	77	70	0	0	0	0	40	3
	2	LISIS	108	140	31	LISIS	0	0	0	0	68	39
	3	168	LISIS	LISIS	36	48	0	0	0			
	4	8		11								
	5	8	40	0								
V29AF_2015	1	LISIS	42	88	0	1	0	0	0	0	LISIS	0
	2	105	9	4	0	0	0	0	0	0	LISIS	LISIS
	3	LISIS	56	32	0	LISIS	0	0	0			
	4	LISIS		150								
	5	29	150	114	0	0						
V30AF_2015	1	25	74	127	68	94	0	0	0	0	0	0
	2	236	32	26	59	300	0	0	0	0	68	100
	3	31	150	150	LISIS	LISIS	0	0	0			
	4	13		0								
	5	10	55	0								
V47AF_2015	1	150	0	90	108	146	0	0	0	0	12	5
	2	77	1	29	47	LISIS	0	0	0	0	29	38
	3	48	0	168	54	67	0	0	0			
	4	10		LISIS								
	5	21	0	0								
V58AF_2015	1	90	18	13	6	10	0	0	0	0	1	1
	2	23	10	4	6	LISIS	0	0	0	0	5	5
	3	7	3	17	3	0	0	0	0			
	4	1		0								
	5	5	6	0		0						
V61AF_2015	1	2	37	77	52	40	0	0	0	0	29	7
	2	73	25	25	25	5	0	0	0	0	60	51
	3	21	14	44	0	0	0	0	0			
	4	48		41								
	5	44	80	20	50	59						
V63AF_2015	1	59	12	20	6	6	0	0	0	0	9	5
	2	35	4	0	2	19	0	0	0	0	20	121
	3	5	1	160	LISIS	LISIS	0	0	0			
	4	15		5								
	5	3	22	0								
V70AF_2015	1	128	9	41	18	26	0	0	0	0	2	32
	2	41	3	8	0	19	0	0	0	0	14	58
	3	9	29	16	0	0	0	0	0			
	4	3		0								
	5	2	5	0	15	14						
V73AF_2015	1	17	6	4	2	10	0	0	0	0	9	0
	2	9	2	0	35	7	0	0	1	0	5	9
	3	0	12	4	20	16	0	0	0			
	4	0		0					0			
	5	2	3	0								
V83AF_2015	1	1	5	14	3	11	0	0	0	0	3	0
	2	10	1	0	3	3	0	0	0	0	9	29
	3	0	1	8	2	0	0	0	0			
	4	0		0								
	5	2	1	0		0						

(D)		AMAD45_2003	AMeDE1_2003	AMeDE_2003	V1.1AMe_2015	V18.4AMe_2015	A14.1AMe_2015	V8.5AMe_2015	A115.1AMe_2015	T13.1AM_2015	A20.1AM_2015	T12.1AM_2015
R3AF_2014	1	4	0	0	2	6	3	7		0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0			
	3	7			0		0	0	0		30	1
	4	0		0	0	0			0	0	0	0
R4AF_2014	1	32	0	8	52	75	0	5		0	9	0
	2	6	4	1	14	23	0	0	0			
	3	12			80		0	0	0		21	3
	4	0		0	0	8			0	0	0	0
R7AF_2014	1	LISIS	12	25	LISIS	LISIS	0	0		0	30	2
	2	19	30	18	0	0	0	0	0			
	3	LISIS			0		0	0	0		23	17
	4	1		3	0	1			0	0	32	0
R24AF_2014	1	LISIS	LISIS	130	LISIS	LISIS	18	53		0	LISIS	25
	2	85	104	70	LISIS	LISIS	0	0	0			
	3	LISIS			27	33	0	0	0		104	31
	4	18		13	LISIS	48			0	0	90	LISIS
A45AF_2014	1	0	0	0	6	2	4			0	14	45
	2	106	0	0	0	0	0	0	0			
	3				0	0	0	0	0		43	6
	4	0		15	0	0			0	0	0	0
A53AF_2014	1	66	0	0	LISIS	LISIS	21			0	10	0
	2	0	0	0	LISIS	29	0	0	0			
	3	11			0	2	0	0	0		88	13
	4	3		0	0	0			0	0	10	0
A55AF_2014	1	LISIS	0	13	LISIS	LISIS	0			0	17	0
	2	0	2	3	LISIS	0	0	0	0			
	3	LISIS			0	0	0	0	0		LISIS	LISIS
	4	0		3	0	0			0	0	0	0
A60AF_2014	1		LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	0			0	LISIS	LISIS
	2	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	0	0	0			
	3				10	19	0	0	0		37	LISIS
	4	56		48	LISIS	LISIS			0	0	LISIS	LISIS
C76AF_2014	1		LISIS	12	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS		0	184	3
	2	5	104	12	0	0	0	0	0			
	3				LISIS	LISIS	0	0	0		LISIS	LISIS
	4	19		LISIS	0	0			0	0	73	0
C79AF_2014	1	34	LISIS	13	LISIS	LISIS	LISIS	LISIS	29	0	68	1
	2	9	9	10	0	0	0	0	0			
	3	LISIS			0	0	0	0	0		LISIS	LISIS
	4	LISIS		LISIS	0	0			0	0	0	0

**Anexo II.** Número de halos de lisis obtenidos en los ensayos de infección. **(A)** AM\_2014 con Alterofagos\_2014. **(B)** AM\_2014 con Alterofagos\_2015. **(C)** AM\_2015 con Alterofagos\_2015. **(D)** AM\_2015 con Alterofagos\_2014. Se indica como LISIS aquellos experimentos en los que el número de halos fue imposible contabilizar (lisis total de las células bacterianas).