



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS MARINOS DEL
PACÍFICO MEXICANO Y ENSAYOS DE CAPACIDAD
INFECTIVA EN BACTERIAS HETERÓTROFAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALEJANDRO MORENO AMBRIZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SILVIA PAJARES MORENO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Adriana Guadalupe Mejía Chavez

VOCAL: Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza

SECRETARIO: Profesor: Silvia Pajares Moreno

1er. SUPLENTE: Profesor: Javier Araiza Santibañez

2° SUPLENTE: Profesor: Tanya Plett Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de ecología microbiana acuática.

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Silvia Pajares Moreno.

SUSTENTANTE:

Alejandro Moreno Ambriz

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencias del Mar y a la Universidad Nacional Autónoma de México por los espacios, recursos y por la oportunidad de desarrollar este proyecto. Al Proyecto PAPIIT-IA201617 de la Dra. Silvia Pajares por subvencionar la investigación llevada a cabo en esta Tesis.

ÍNDICE

I. <u>RESUMEN</u>	7
II. <u>INTRODUCCIÓN</u>	8
II.1 Microbiología en la columna de agua marina.....	8
II.2 Importancia y biodiversidad de los virus marinos	10
II.3 El impacto de los bacteriófagos en la biogeoquímica marina	11
II.4 Ciclos replicativos y sus consecuencias en el ecosistema marino.....	13
III. <u>ANTECEDENTES Y ESTUDIOS ACTUALES SOBRE BACTERIÓFAGOS MARINOS</u>	15
III.1 Importancia del estudio de virus en la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Mexicano	17
IV. <u>JUSTIFICACIÓN</u>	18
V. <u>HIPÓTESIS</u>	19
VI. <u>OBJETIVOS</u>	19
VI.1 Objetivo general.....	19
VI.2 Objetivos particulares.....	20
VII. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
VII.1 Cultivos bacterianos.....	20
VII.2 Muestreo y procesamiento de las muestras de agua.....	20
VIII.3 Estimación de la curva del crecimiento bacteriano por Densidad óptica.....	21
VII.4 Ensayos de infección.....	22
VII.5 Ensayos de viabilidad.....	23
VII.6 Ensayos de infección cruzada.....	24
VIII.7 Titulación Viral.....	24
VIII. <u>RESULTADOS</u>	25
VIII.1 Perfiles oceanográficos de las estaciones.....	25
VIII.2 Estimación de la curva del crecimiento bacteriano por densidad óptica.....	29
VIII.3 Ensayos de infección.....	30

VIII.4	Ensayo de viabilidad.....	33
VIII.5	Ensayos de infección cruzada.....	35
VIII.6	Titulación Viral.....	35
IX.	<u>DISCUSIÓN</u>	37
X.	<u>CONCLUSIONES</u>	43
XI.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	44

ÍNDICE DE FIGURAS

• Figura 1. Morfología de los bacteriófagos más abundantes en el océano.....	11
• Figura 2. Esquema de la deriva viral.....	12
• Figura 3. Ciclo lítico y ciclo lisogénico.....	14
• Figura 4. Mecanismo de transferencia horizontal de genes bacterianos mediados por fagos.....	14
• Figura 5. Distribución del oxígeno disuelto en el océano a los 300 m de profundidad.....	17
• Figura 6. Mapa de la ubicación de las estaciones.....	21
• Figura 7. Escala establecida para la comparación visual del desarrollo bacteriano tras la inoculación de las muestras en el ensayo de infección.....	22
• Figura 8. Esquema de trabajo de los ensayos realizados.....	23
• Figura 9. Perfil de concentración de oxígeno en mg/L.....	26
• Figura 10. Perfil de concentración clorofila por fluorescencia en mg/m ³	27
• Figura 11. Perfil de temperatura de las estaciones muestreadas.....	28
• Figura 12. Perfil de salinidad de las estaciones muestreadas.....	28
• Figura 13. Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas.....	29
• Figura 14. Resultados de puntuación de lisis tras la exposición a las muestras de agua.....	31
• Figura 15. Muestras con mayor puntaje de lisis.....	33
• Figura 16. Ensayo de viabilidad tras infección.....	34
• Figura 17. Ensayos de infección cruzada.....	35
• Figura 18. Cantidad estimada de partículas virales en la muestra de agua más infectiva	36

I. RESUMEN

En este trabajo se aborda el estudio de los bacteriófagos y su interacción con bacterias heterótrofas presentes en la columna de agua del Océano Pacífico dentro del territorio mexicano. El muestreo se llevó a cabo a bordo del B/O “El Puma” en los cruceros MareaR X y MAZ-IV realizados en el mes de abril del 2018 en cuatro estaciones, una costera y una oceánica, en frente de Mazatlán y de Maruata.

Las cepas seleccionadas para los ensayos pertenecieron a los géneros *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Sulfitobacter* y *Vibrio*, y fueron obtenidas en la misma zona de estudio. Las cepas fueron expuestas a los bacteriófagos presentes en las muestras de agua filtrada obtenidas a tres profundidades diferentes (5 m, primer máximo de clorofila y final de la oxiclina). El grado de infección se determinó mediante un puntaje asociado a la pérdida de turbidez en los cultivos en medio líquido y la formación de sedimento. De las muestras que presentaron mayor lisis se recuperó el sobrenadante y se realizó nuevamente una infección en todas las cepas para observar si hubo una propagación de los virus presentes, así como un mayor grado de infección. Finalmente se estimó la cantidad de partículas virales infecciosas mediante ensayos en placa en la muestra de agua y la cepa que presentaron mayor grado de infección.

Las muestras que mayor virulencia presentaron fueron las pertenecientes a la estación costera de Maruata, en particular la del primer máximo de clorofila. En general, la profundidad que mostró mayor capacidad infectiva en los ensayos realizados fue el final de la oxiclina, el cual es un nicho de biodiversidad muy importante. La cepa que se vio más afectada por los virus presentes en las muestras fue *Rhodococcus* y la que resultó menos susceptible fue *Sulfitobacter*.

II. INTRODUCCIÓN

El océano cubre alrededor del 70% de la superficie terrestre y en él habita la mayor diversidad de organismos. De éstos, los virus son por mucho la forma de diversidad genética más abundante en la Tierra, ya que se estima que hay cerca de 10^{30} partículas virales suspendidas en todo el océano (Danovaro et al., 2011), superando en una proporción 10:1 a los organismos celulares (Breitbart et al., 2018). Si bien los virus representan el 94% de las partículas que contienen ácido nucleico en los océanos, solo comprenden una proporción minúscula de la biomasa total debido a su pequeño tamaño (Suttle et al., 2007).

El estudio de los virus en los océanos ha sido clave para muchos descubrimientos: desde el descubrimiento de que los virus han originado nuevos linajes de genes fotosintéticos, como los cianófagos que infectan a *Synechococcus* y *Prochlorococcus* (Lindell et al., 2005; Mann et al., 2003), a la identificación de nuevas familias virales que desafían gran parte de la sabiduría convencional sobre la historia de la vida viral (por ejemplo, el descubrimiento de virus "gigantes" que infectan algas (Derelle et al., 2008) e incluso virus que parasitan otros virus (La Scola et al., 2008). Además, los virus son actores principales en la mortalidad de microorganismos marinos y, en consecuencia, afectan los ciclos de nutrientes y energía, así como la estructura de las comunidades microbianas (Wommack et al., 2000; Suttle et al., 2007).

II.1 Microbiología en la columna de agua marina

El equilibrio de los ecosistemas marinos es muy dinámico y depende de diversos factores. Parámetros como la profundidad, así como los gradientes de temperatura, oxígeno, salinidad, presión, nutrientes y luminosidad propician la formación de nichos en los que distintos tipos de organismos pueden adaptarse y habitar. Los microorganismos que habitan estos nichos son los responsables

de los flujos de materia y energía en los ecosistemas marinos y, junto con los virus (Breitbart et al., 2018), forman un complejo sistema organizado en el bioma marino (Danovaro et al., 2011).

El océano es muy vasto y en él se pueden encontrar muy diversos hábitats, como arrecifes, pastos marinos, sedimentos, bosques de algas, etc. En todos ellos está presente la columna de agua, la cual presenta sus propios ecosistemas (Lalli y Parsons, 2006). La columna de agua es un sistema mayormente oligotrófico, esto quiere decir que es pobre en nutrientes. En el agua se encuentran suspendidos innumerables microorganismos que forman parte de las redes tróficas y participan en los ciclos biogeoquímicos (Flaviani et al., 2017). A este conjunto de organismos se les denomina plancton, el cual está conformado por organismos celulares eucariontes, procariontes (bacterias y arqueas) y virus. Dentro de ellos, los productores primarios (fitoplancton) son los principales responsables de la introducción de materia orgánica a las redes tróficas. Por otro lado, las bacterias heterótrofas son las responsables de la mineralización de la materia orgánica que se encuentra disuelta en el medio.

Cuando el fitoplancton muere libera al medio materia orgánica disuelta (MOD) y materia orgánica particulada (MOP), que pueden ser aprovechados por los organismos heterótrofos (Middelboe y Lyck, 2002). Las bacterias heterótrofas tienen un rol fundamental en el flujo de materia y energía en el ecosistema, al interactuar con gran parte la MOP y MOD (Wiebinga et al., 1997) a través del bucle microbiano (Anderson y Ducklow, 2013).

Los virus juegan un papel esencial como depredadores de los microorganismos acuáticos. Dentro de los virus presentes en el océano, los bacteriófagos son los más numerosos (Breitbart et al., 2018). Los fagos son aquellos virus que infectan exclusivamente a bacterias, por lo que tienen un impacto directo en el flujo de la MOD en la columna de agua. Asimismo, los virus tienen un impacto directo en las poblaciones de organismos procariontes, actuando como una de las principales causas de mortalidad y, por tanto, como control del número de individuos y manteniendo un sano equilibrio en el ecosistema (Suttle et al.,

2007; Vaqué et al., 2014). Se estima que del 10% al 30% de la producción bacteriana se pierde como MOD en el océano por el efecto de la lisis viral (Middelboe, 2010).

II.2 Importancia y biodiversidad de los virus marinos

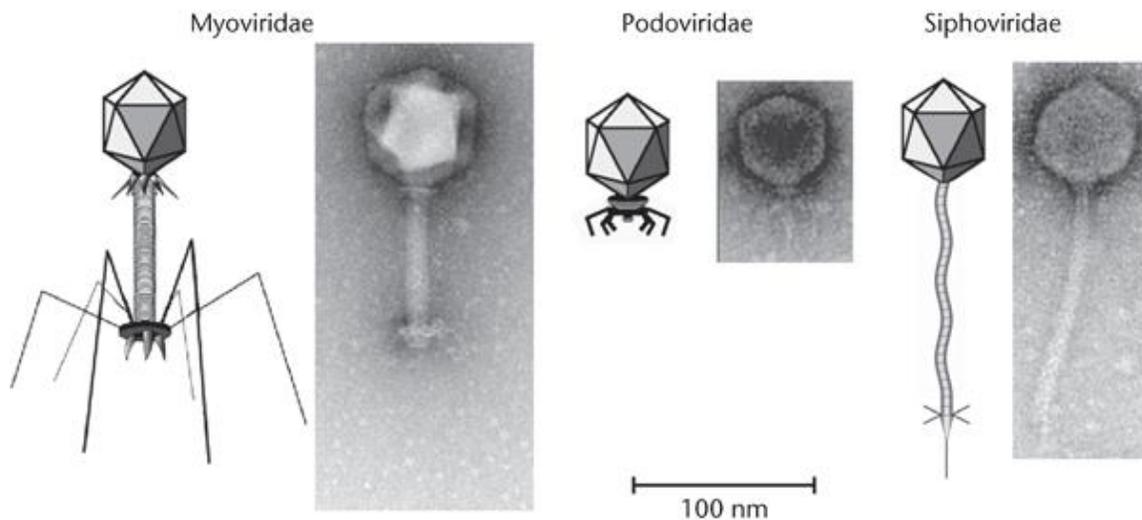
Los virus marinos tienen un rol fundamental en el equilibrio y diversidad de los organismos, en particular los bacteriófagos, los cuales son vitales en procesos biogeoquímicos y son la base de las redes tróficas marinas (Breitbart, et al., 2018). De hecho, los bacteriófagos son los principales responsables de la recombinación genética y de la transferencia horizontal de genes en las bacterias marinas (Jiang y Paul, 1998). Dado que son capaces de integrar su genoma al del hospedero, pueden provocar cambios en las secuencias codificantes de éste. De igual manera, cuando ocurre la lisis de una bacteria, los ácidos nucleicos que contenía se liberan al medio, pudiendo haber fragmentos que alguna bacteria competente pueda asimilar e integrar a su propio genoma.

Los bacteriófagos pertenecientes al orden de los *Caudovirales* son los más abundantes y los virus más estudiados en el océano (Ackermann, 2001). Este orden se ha descrito desde el año 1959, representando el 96% de las morfologías descritas en las muestras oceánicas. Los *Caudovirales* tienen un genoma de cadena doble de DNA el cual se encuentra contenido en una cápside icosaédrica. Como el nombre del orden lo indica, los *Caudovirales* son virus cuya cápside cuenta con una cola que propicia el anclaje a la pared celular de la célula hospedero para dar inicio a la infección.

Los *Caudovirales* representan entre el 60% y 90% del viroma en aguas oceánicas (Haro-Moreno et al., 2017). De este porcentaje, la familia *Myoviridae* ocupa alrededor del 45%, la familia *Syphoviridae* el 30% y la familia *Podoviridae* el 25% (Figura 1) (Flaviani et al., 2017). La familia *Myoviridae* se caracteriza por tener una cápside con cola, que una vez anclada a la pared celular del hospedero, la lisa y se contrae para inyectar su genoma en el citoplasma (King et al., 2012). De forma similar, las familias *Podoviridae* y

Syphoviridae se anclan a la pared celular del hospedero e introducen su genoma al citoplasma. Todos ellos cuentan con genes que codifican su propia polimerasa y helicasa, proteínas estructurales y una región promotora para la regulación de la transcripción del genoma viral (Marintcheva, 2018).

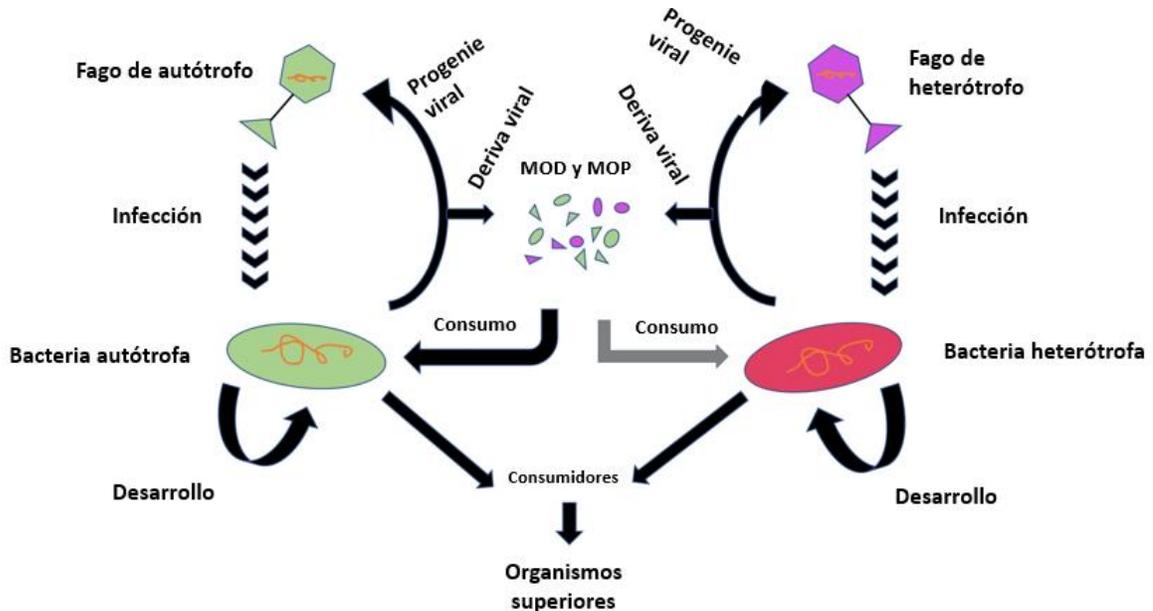
Figura 1. Morfología de los bacteriófagos más abundantes en el océano. Imagen recuperada de Harper et al. (2014).



II .3 El impacto de los bacteriófagos en la biogeoquímica marina

La mortalidad de microorganismos inducida por virus tiene efectos directos en la función del ecosistema marino. La lisis bacteriana por los bacteriófagos implica la liberación de carbono orgánico y otros nutrientes al medio marino, que se conoce como “deriva viral” (Wilhelm y Suttle, 1999). Ésta consiste en un proceso cíclico previo al inicio de la cadena trófica tradicional. Las bacterias productoras primarias se encargan de transformar el CO₂ en materia orgánica y proliferar. Al ser infectadas y lisadas por bacteriófagos, la materia orgánica que contenía la célula es liberada al medio en forma de MOD y MOP (Figura 2). De esta forma son aprovechados por organismos heterótrofos, que a su vez son infectados y lisados por virus (Weitz y Wilhelm, 2012).

Figura 2. Esquema de la deriva viral. Imagen recuperada de:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Viral_Shunt_.jpg



El nitrógeno, un elemento limitante para la productividad en los ecosistemas marinos, es otro elemento que se ve afectado directamente por la actividad de los bacteriófagos a través del proceso de la deriva viral. La deriva viral es clave en el reciclaje del nitrógeno orgánico disuelto. Dado que los virus infectan y lisan bacterias que participan activamente en el ciclo del nitrógeno, al morir estas bacterias lo liberan al medio en forma de MOD y MOP. Parte de esta MOP que no es asimilada por los organismos presentes en aguas superficiales se dirigen hacia aguas más profundas, en las que hay baja concentración de oxígeno, donde otros organismos son capaces de remineralizarla y continuar el ciclo (Jetten, 2008). De igual manera, el fósforo es uno de los nutrientes principales para los organismos marinos, incluidos los mismos virus, que también se ve afectado por la deriva viral.

Por lo tanto, los fagos marinos tienen un impacto directo en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo, así como de los elementos traza (Henderson y Henderson, 2016; Weitz y Wilhelm, 2012). Como consecuencia de la lisis de las células microbinas ocasionada por los bacteriófagos, estos elementos en

sus distintas formas son transportados y reciclados a lo largo de la deriva viral.

II. 4 Ciclos replicativos y sus consecuencias en el ecosistema marino

Los bacteriófagos cuentan con exolisinas, que son proteínas en la cápside que permiten la infección de sus hospederos (Young, 1992). La infección viral ocurre cuando la cápside del fago se ancla a la superficie de la bacteria con las fibras proteicas. Para que esto ocurra la célula objetivo debe contar con los receptores adecuados en la superficie. Si esto se logra, las lisinas degradan la pared celular e inyecta el material genético al citoplasma. Se realiza la transcripción de los genes que permiten la apropiación de la maquinaria enzimática que actúa sobre el material genético.

En este punto de la infección pueden ocurrir dos distintos tipos de ciclos, el lítico y el lisogénico, ambos son procesos mediados por promotores (Dini, 2011), los cuales son regiones ubicadas al extremo del genoma que regulan la expresión de los genes virales.

En el ciclo lítico comienza inmediatamente la transcripción y traducción de los genes que codifican la cápside, la cola y las fibras. De igual manera, comienza la replicación del genoma viral, el cual será empaquetado dentro de las nuevas cápsides y posteriormente se ensamblará para producir viriones maduros. Cuando la cantidad de viriones en la célula rebasa su capacidad de contenerlos, la membrana celular se rompe, lisando así la célula y liberándose los viriones producidos al medio (Figura 3).

En el ciclo lisogénico el material genético del fago se integra al genoma bacteriano mediante un proceso de recombinación, pudiendo ocurrir una modificación de una secuencia de algún gen. Este estado del virus se denomina “profago”. En cualquier momento el genoma del virus puede ser escindido del cromosoma bacteriano y continuar con el ciclo replicativo. Cuando esto ocurre, algunos genes bacterianos pueden pasar a formar

parte del ADN que se va a empaquetar dentro de las cápsides. Este virión con material genético bacteriano puede infectar a otra bacteria cuyo genoma no contenía dicha información, fenómeno conocido como transferencia horizontal de genes bacterianos (Figura 4) (Galvani, 2003).

Figura 3. Ciclo lítico y ciclo lisogénico. Imagen obtenida y modificada de: Prada-Peñaranda et al. (2014).

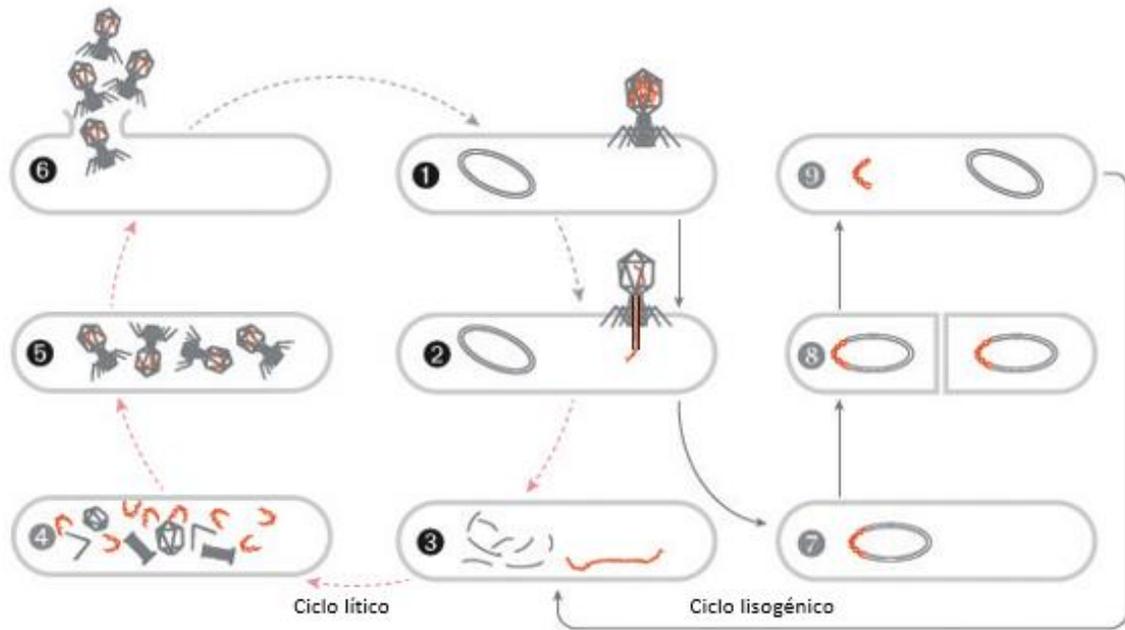
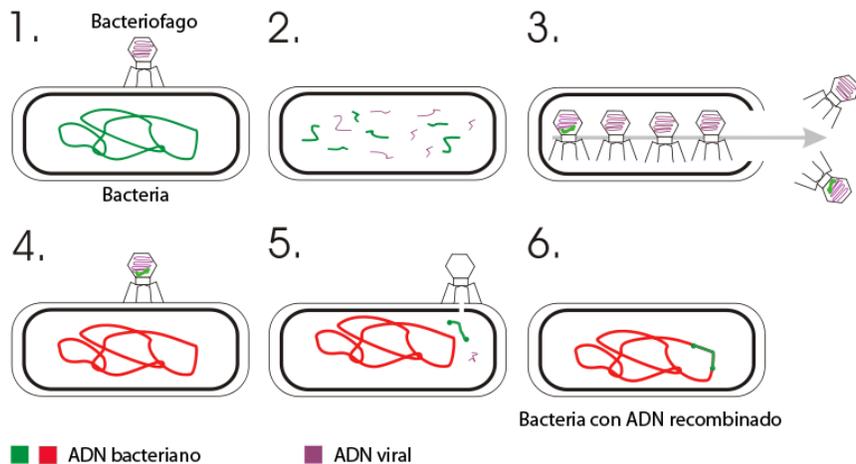


Figura 4. Mecanismo de transferencia horizontal de genes bacterianos mediados por fagos.

Imagen recuperada de:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transduction_genetic_fr.svg



Otro mecanismo indirecto por el cual algunas bacterias son capaces de adquirir nuevos genes es la transformación. Como consecuencia de la lisis bacteriana por la producción de progenie viral, se libera al medio su DNA; si una bacteria competente natural, entre las que se encuentra *Vibrio*, puede asimilar este ADN exógeno, habrá modificado su genoma (Stewart y Carlson, 1986; Zeaiter et al., 2018).

La infección viral de los microorganismos tiene efectos directos en la composición de la comunidad microbiana marina. Los virus son, en algunos casos, tan importantes como los herbívoros para matar a éstos de forma selectiva, mientras que, en otros casos, pueden ser la fuente dominante de mortalidad microbiana (Weitz y Wilhelm, 2012). Por lo tanto, los virus marinos juegan un papel relevante en la regulación de la biomasa microbiana marina, en particular sobre los florecimientos (Weinbauer et al., 2006). Además, los bacteriófagos pueden infectar huéspedes de diferentes especies o incluso de diferentes géneros. Por ejemplo, algunos cianófagos pueden infectar diferentes cepas dentro de la misma especie de cianobacterias, ya sea *Synechococcus* o *Prochlorococcus*.

III. ANTECEDENTES Y ESTUDIOS ACTUALES SOBRE BACTERIÓFAGOS MARINOS

El estudio de los bacteriófagos se ha llevado a cabo desde la segunda década del siglo XX; en estos años se entendió su potencial para la lisis bacteriana y su importante papel en los ecosistemas (Keen y Gables, 2016). Posteriormente, con la llegada de las herramientas de la biología molecular, los estudios se enfocaron en los bacteriófagos que infectan a *E. coli*, los cuales permitieron un gran avance en el entendimiento de los mecanismos de infección y replicación (Clokier et al., 2011). Con este nuevo conocimiento, el panorama se abrió enormemente, dando pie a un gran abanico de áreas de estudio, una de estas es la ecología microbiana marina.

Una de las herramientas por excelencia para el estudio de los virus es su cultivo y propagación *in vitro*. Desde los años 50 se han realizado estudios de la relación de los bacteriófagos con sus hospederos con el fin de identificar el cambio que produce la infección en éstos (Groman y Lockart, 1953). Estas técnicas han representado un primer paso de suma importancia, ya que proporcionan un excelente panorama general y corrobora la presencia de los virus que se buscan estudiar (Casey et al., 2018).

Por otro lado, el océano es uno de los ecosistemas menos estudiados dada la dificultad de acceso a éste y a su vastedad. La gran cantidad de nichos existentes en los sistemas marinos promueve una gran diversidad y abundancia de virus, que a su vez tienen una influencia directa en las especies que pueden proliferar en éstos (Seed, 2015). Actualmente, el estudio y caracterización de los virus marinos se apoya en métodos de biología molecular, combinados con la citometría de flujo y técnicas modificadas de hibridación *in situ* (Brussard, 2009; Onodera, 2009; Vilas Boas, 2016). Por ejemplo, el descubrimiento de nuevos linajes de virus marinos por medio de la genómica se ha incrementado significativamente en las últimas dos décadas, sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en los cianófagos (Middelboe, 2017). Un campo interesante y reciente es el estudio de la distribución de los virus marinos por medio de la metagenómica a lo largo de periodos de tiempo (Luo et al., 2017).

Un nuevo enfoque en el estudio de los virus marinos es hacia aquellos que no tienen cápside con cola. Mediante estudios metagenómicos se identificó y caracterizó un grupo de virus de DNA de doble cadena cuyo genoma estaba cerca de las 10-kb y pertenecen a los virus cuya cápside tiene un arreglo *Double Jelly Roll*. Éstos son capaces de infectar y lisar distintas cepas del género *Vibrio* y han sido pasados por alto por mucho tiempo a pesar de tener un papel fundamental en el ecosistema marino (Kauffman et al., 2018).

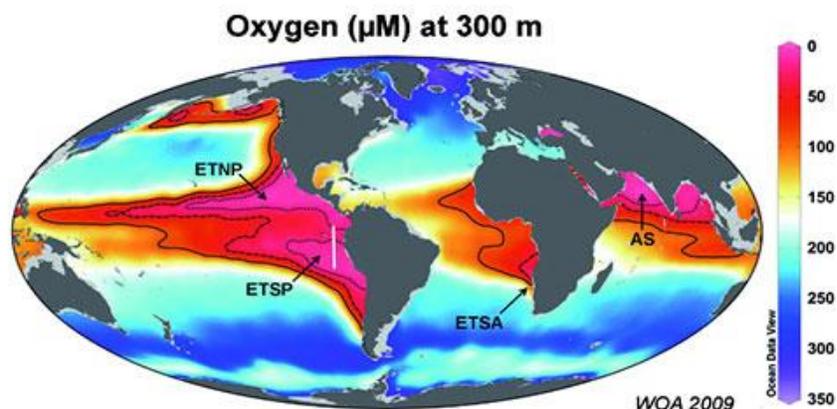
Otras técnicas claves para la identificación y cuantificación de los virus son la microscopía electrónica de transmisión y de epifluorescencia. De esta forma se

han podido identificar y caracterizar gran cantidad de bacteriófagos presentes en el océano (Alonso et al., 2002). Por ejemplo, se han podido caracterizar bacteriófagos de ambientes extremos, como es el caso de los fagos 9A y 34H, los cuales infectan a *Colwellia psychrerythraea*, una bacteria psicrófila facultativa del océano Ártico (Wells y Deming, 2006).

III.1 Importancia del estudio de virus en la Zona de Mínimo Oxígeno del Pacífico Mexicano

En el océano existen áreas entre los 100 y 1500 m de profundidad en las que la concentración de oxígeno disuelto es muy baja y son conocidas como Zonas de Mínimo Oxígeno (ZMOs). Estas ZMOs se forman en zonas de surgencias asociadas a una ventilación reducida y a la respiración de la materia orgánica que se hunde producida por los fotótrofos en la superficie (Paulmier y Ruiz-Pino, 2008). Las ZMO están presentes en las aguas tropicales, como en el mar Árábigo, el Pacífico Norte tropical oriental (ETNP) en frente de México y el Pacífico Sur tropical oriental (ETSP) en frente de Perú y Chile (Figura 5). Las ZMOs son de interés particular porque ocupan solo el 0.1-0.2% del volumen total del océano (Codispoti et al., 2001), pero son fuentes importantes de N₂O, un potente gas de efecto invernadero, representando alrededor del 30-50% de la pérdida de N fijado en el océano (Jayakumar et al., 2009).

Figura 5. Distribución del oxígeno disuelto en el océano a los 300 m de profundidad. Obtenido de: WOA (2009).



Las condiciones de deficiencia de oxígeno en las ZMOs afectan a los macroorganismos móviles, lo que hace que estas regiones estén dominadas por microorganismos que participan en metabolismos anaerobios de los ciclos del nitrógeno y del azufre (Ulloa et al., 2012; Wright et al., 2012). Las ZMOs, particularmente la del Pacífico Mexicano, son áreas únicas en el océano global en la que se han realizado pocos estudios sobre la ecología de las comunidades microbianas y, en particular, de los bacteriófagos asociados a ellas (Cassman et al., 2012). Por lo tanto, estudios en estas ZMOs representan una oportunidad excepcional para ampliar el conocimiento de la virología de la zona y el impacto ecológico que ésta pudiera tener.

En el Pacífico Mexicano convergen al menos dos corrientes marinas, una proveniente del norte y la otra de Centroamérica, que dan lugar una importante diversidad biológica (Cepeda-Morales et al., 2009). Estas corrientes provocan surgencias intermitentes a lo largo del año frente a las costas de Nayarit y Jalisco y son importantes porque transportan una gran cantidad de nutrientes hacia la superficie, donde los productores primarios (algas y cianobacterias) así como organismos heterótrofos pueden aprovecharlos y proliferar, haciendo de estas aguas muy ricas en biodiversidad y abundancia. Sin embargo, hasta la fecha en esta zona del Pacífico se desconoce la diversidad de los bacteriófagos, así como su dinámica e interacción con sus hospederos.

IV. **JUSTIFICACIÓN**

Los bacteriófagos son depredadores de las bacterias presentes en los océanos y tienen un rol fundamental en el equilibrio de los ecosistemas acuáticos. El estudio de las interacciones virus-hospedero es clave en el entendimiento del papel de los virus y su impacto en los ambientes marinos, en particular en aguas de la ZMO del Pacífico Mexicano, dado que las condiciones ambientales son muy particulares. Por esto, es importante plantear ensayos sencillos y confiables que permitan el aislamiento y propagación de fagos marinos para su

estudio *in vitro*, así como conocer su especificidad y capacidad ante los hospederos disponibles para el fago en cuestión, sobre todo de aquellos que infectan bacterias heterótrofas en la columna de agua. Actualmente, una enorme cantidad de bacteriófagos marinos permanece sin caracterizar y es un campo donde se necesita profundizar el conocimiento.

V. HIPÓTESIS

- Se espera encontrar una mayor cantidad de fagos en las muestras de agua del Pacífico Mexicano provenientes de la zona del primer máximo de clorofila por ser un nicho donde prospera una gran diversidad de microorganismos.
- En las muestras de agua costera encontrarán una mayor cantidad de fagos debido a que la disponibilidad de nutrientes es mayor para los microorganismos que en las zonas más oceánicas.
- Los fagos de la zona costera serán los que tendrán mayor capacidad infectiva y rango de hospederos que en la zona oceánica.
- Habrá bacterias heterótrofas marinas con mayor susceptibilidad a la infección viral que otras.

VI. OBJETIVOS

- **Objetivo general:**

Conocer la capacidad infectiva de los fagos obtenidos de muestras de agua del Pacífico Mexicano en cuatro cepas bacterianas aisladas de los mismos ambientes.

Objetivos particulares:

1. Probar la susceptibilidad de los hospederos bacterianos a la infección por los fagos obtenidos de muestras de agua colectadas en diferentes zonas y profundidades en el Pacífico Mexicano.
2. Estimar la cantidad de partículas virales efectivas en las muestras de agua del Pacífico Mexicano obtenidas en estaciones costeras y oceánicas y a tres profundidades diferentes.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Cultivos bacterianos

Las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos pertenecieron a los géneros *Rhodococcus*, *Sulfitobacter*, *Marinobacter* y *Vibrio*, las cuales fueron aisladas de las mismas zonas donde se tomaron las muestras de agua para el aislamiento de virus en el Pacífico tropical mexicano.

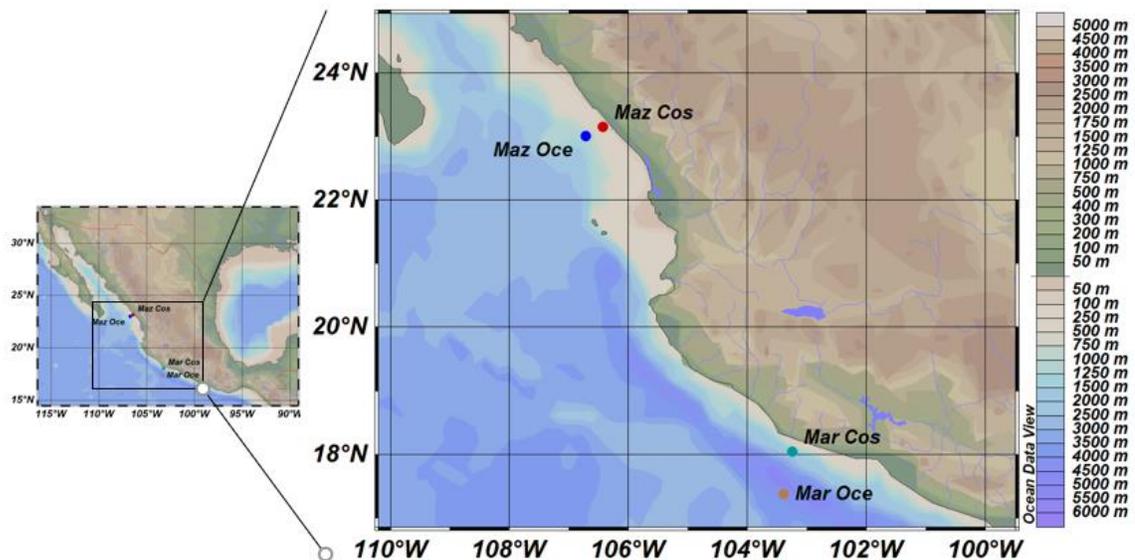
Se partió de cultivos congelados a -80°C y se sembraron por estriado en cajas Petri sobre agar medio marino a 23°C. Posteriormente, cada ocho días se hicieron subcultivos de mantenimiento para realizar los ensayos posteriores.

VII.2 Muestreo y procesamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua se obtuvieron en el crucero Marear X llevado a cabo en abril de 2018 a bordo del B/O “El Puma” (UNAM) en cuatro estaciones de muestreo (dos oceánicas y dos costeras) (Figura 6). Se recolectó agua a tres profundidades diferentes mediante botellas Niskin acopladas a una roseta: 5 m, primer máximo de clorofila (PMC) y final de la oxiclina (FinOx). Las muestras recolectadas se obtuvieron de las estaciones *Mar Cos*, *Mar Oce*, *Maz Cos* y *Maz Oce*, para facilitar la identificación de éstas.

Los parámetros físicoquímicos del agua (oxígeno disuelto, temperatura, salinidad y fluorescencia) de las estaciones se obtuvieron con un CTD acoplado a la roseta y se procesaron en el software Ocean Data View (versión 5.0, <https://odv.awi.de/>) para elaborar los perfiles de las estaciones muestreadas.

Figura 6. Mapa de la ubicación de las estaciones de muestreo en la costa del Pacífico Mexicano.



Se filtraron 200 mL de agua por muestra a través de membranas de ésteres de celulosa Millipore de 0.22 μm . Cada muestra se guardó por duplicado en botellas de plástico estériles, agregando a uno de los duplicados dos gotas de cloroformo para eliminar bacterias que hayan podido pasar a través del filtro. Posteriormente, se almacenaron en un congelador a -20°C .

VII.3 Estimación de la curva del crecimiento bacteriano por densidad óptica

En una campana de flujo laminar, se realizaron cultivos de las cepas de *Rhodococcus*, *Sulfitobacter*, *Marinobacter* y *Vibrio* en caldo con medio marino por duplicado en tubos de ensayo de 15 mL y se incubaron a 23°C en agitación a 150 rpm. Se realizó la lectura de las absorbancias a una

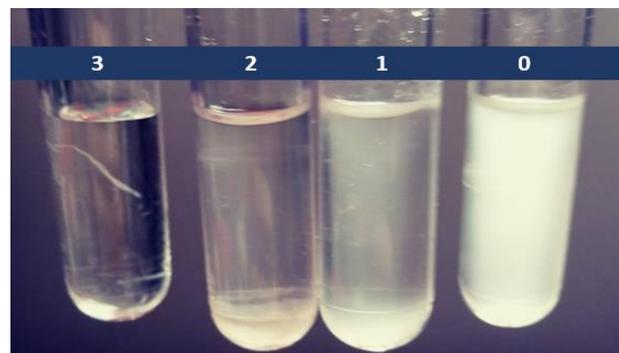
longitud de onda de $\lambda=600$ nm en una celda de vidrio. El caldo medio marino se utilizó como blanco. La lectura de las absorbancias de los cultivos se realizó a los siguientes tiempos (h): 0, 2, 18, 24, 44 y 48.

VII.4 Ensayos de infección

En campana de flujo laminar, se realizaron cultivos por duplicado de las cepas de *Rhodococcus*, *Sulfitobacter*, *Marinobacter* y *Vibrio* en 3 mL de caldo con medio marino en tubos de ensayo estéril de 15 mL. Tras haber pasado 48 h de incubación a 23°C en agitación a 150 rpm, se añadió a cada tubo 1000 μ L de la muestra de agua marina filtrada correspondiente. Al control negativo no se le agregó nada.

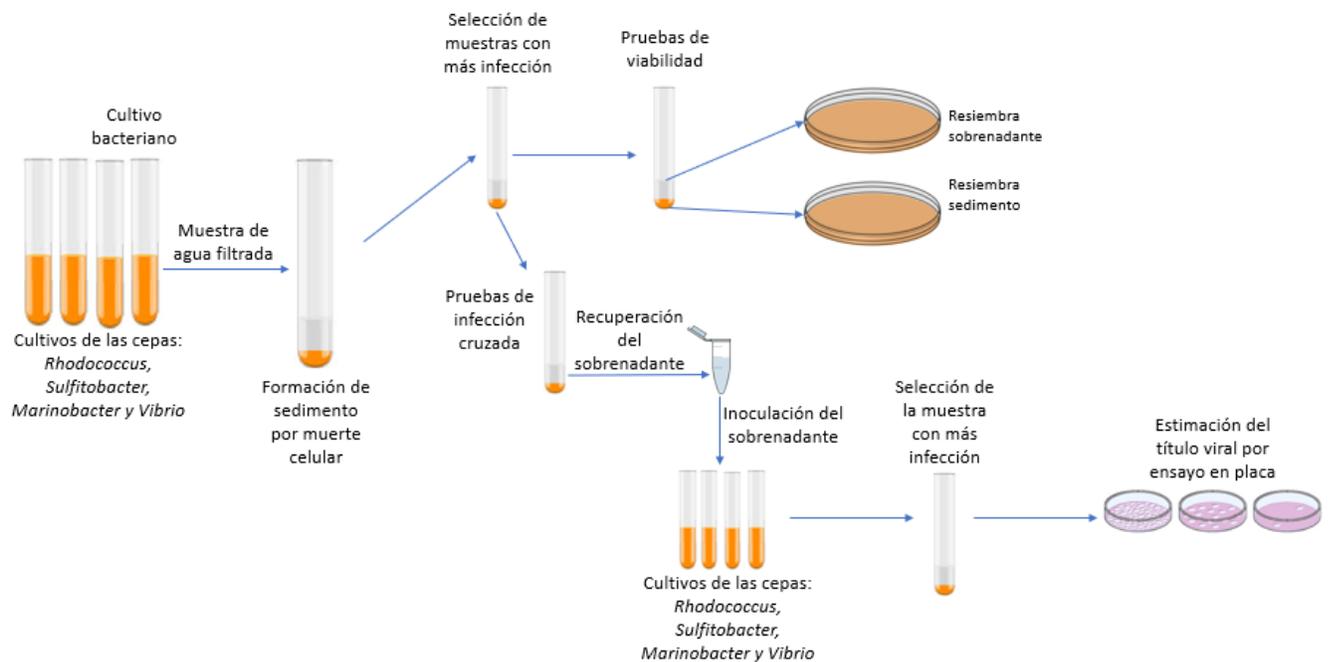
Los tubos inoculados y el control (cultivo sin muestra inoculada) se incubaron con agitación a 150 rpm y a 23°C por 24 h. Posteriormente, se observaron los tubos y se describió la pérdida de turbidez y formación de sedimento mediante un gradiente visual cualitativo en relación al control (Figura 7). A cada tubo se le asignó un puntaje del 0 al 3 tanto para cuantificar la pérdida de turbidez como la formación de sedimento, de manera que los valores más altos significan pérdida total de turbidez y mayor formación de sedimento. Se hizo la suma de ambos puntajes, de manera que el máximo puntaje posible (6) significa lisis celular total.

Figura 7. Escala establecida para la comparación visual del desarrollo bacteriano tras la inoculación de las muestras en el ensayo de infección. Puntaje (de 0 a 3) para cuantificar la pérdida de turbidez y la formación de sedimento. El control tuvo un puntaje de 0.



A partir de los resultados obtenidos en este ensayo se decidió con qué muestras de agua y cepas bacterianas se trabajaría en los ensayos subsiguientes (Figura 8).

Figura 8. Esquema de trabajo de los ensayos realizados.



VII.5 Ensayos de viabilidad

En la parte posterior de una caja Petri con agar medio marino se realizaron diez divisiones, las cuales se rotularon de acuerdo con la muestra de agua de procedencia y la fracción a sembrar (sobrenadante o sedimento). Cinco divisiones se utilizaron para sembrar los sobrenadantes obtenidos de los ensayos con mayor sedimento formado y las otros cinco para la siembra del sedimento producido.

Dentro de la campana de flujo laminar, el sobrenadante se decantó en un tubo de ensayo estéril y se dejó escurrir por 3 min. Se tomó una asada del sobrenadante y se realizó una siembra por punteo en la zona

correspondiente de la caja Petri. De igual forma, se inoculó el sedimento con un asa microbiológica y se realizó un sembrado por punteo en la zona correspondiente de la caja Petri.

VII.6 Ensayos de infección cruzada

Se filtraron los cinco sobrenadantes recuperados del ensayo de viabilidad a través de un filtro para jeringa Millipore de 0.22 μm con el fin de eliminar las bacterias presentes y obtener los fagos suspendidos en el cultivo. El medio filtrado se colocó en tubos de ensayo de 15 mL estériles, los cuales fueron almacenados en refrigeración a 4°C.

Se prepararon 4 tubos con 3 mL de caldo con medio marino. Se inoculó cada cepa en su correspondiente tubo y se incubaron por 48 h a 23°C. Posteriormente, se inocularon los tubos con 1000 μL del sobrenadante filtrado correspondiente y se incubaron con agitación a 150 rpm y 23°C por 24 h. Se realizó nuevamente una comparación mediante un gradiente visual cualitativo para determinar el grado de formación de sedimento y turbidez.

VII.7 Titulación viral

Se eligió la cepa *Rhodococcus* para realizar este ensayo porque fue la que presentó mayor formación de turbidez en mayor cantidad de muestras (véase Figura 14 en la sección de resultados), así como el sobrenadante recuperado de la infección con la muestra PMC de *Mar Oce*.

Se colocaron 5 mL de la suspensión de *Rhodococcus* en un tubo de Falcon estéril de 15 mL y se incubó por 24 h a 23°C a 150 rpm. Posteriormente, se inoculó 100 μL del sobrenadante filtrado en 900 μL de solución buffer de fosfato (PBS) estéril en un tubo Eppendorf (se eligió el sobrenadante de la muestra que produjo mayor infección). Se tomó 100 μL de éste y se transfirió a otro tubo Eppendorf con 900 μL de PBS estéril, así se realizaron diluciones sucesivas de 1 hasta 10^{-5} .

En la campana de flujo laminar, se añadieron 0.5 mL de la suspensión bacteriana a 6 tubos Eppendorf y se agitaron. Se prepararon 20 mL de una solución de agarosa con una concentración de 7.5 g/L y se calentó hasta solubilizarla completamente, de la cual se añadió 3 mL a tubos Falcon estériles de 15 mL. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura aproximada de 45°C se vertió el contenido de los tubos Eppendorf en cada uno de los tubos Falcon con la dilución correspondiente.

Se prepararon 6 cajas Petri con agar medio marino y se rotularon con la dilución correspondiente. Los tubos se agitaron y se vertieron sobre el agar en la caja Petri correspondiente para realizar el cultivo en dos capas. Se dejó enfriar y solidificar por 10 min y se incubaron por 24 h a 23°C.

Pasado el tiempo de incubación, se contaron las placas de lisis formadas para realizar el cálculo de las unidades formadoras de placa (UFP) utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{placas}{dV}$$

Donde el total de placas contadas se divide entre el factor de dilución (d) y el volumen inoculado (V).

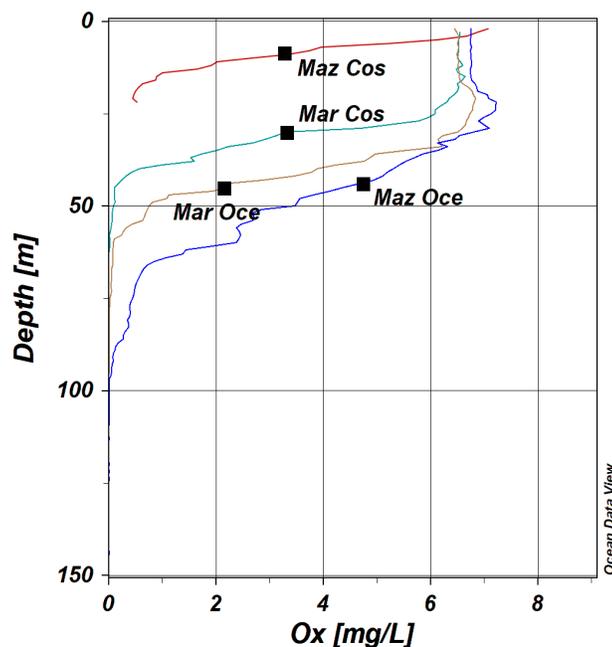
VIII. Resultados

VIII.1 Perfiles oceanográficos de las estaciones

En el perfil de oxígeno de las estaciones se puede apreciar que en la estación *Maz Cos* disminuyó la concentración de oxígeno más rápidamente; cabe mencionar que se trata de una estación costera de 22 m de profundidad, por lo que el equilibrio de intercambio de gases se ve más limitado que las estaciones con profundidades mayores (Figura 9). El FinOx, donde el oxígeno prácticamente ha desaparecido, muestra el comienzo de la ZMO en esta zona del Pacífico, el cual comienza a una profundidad mucho

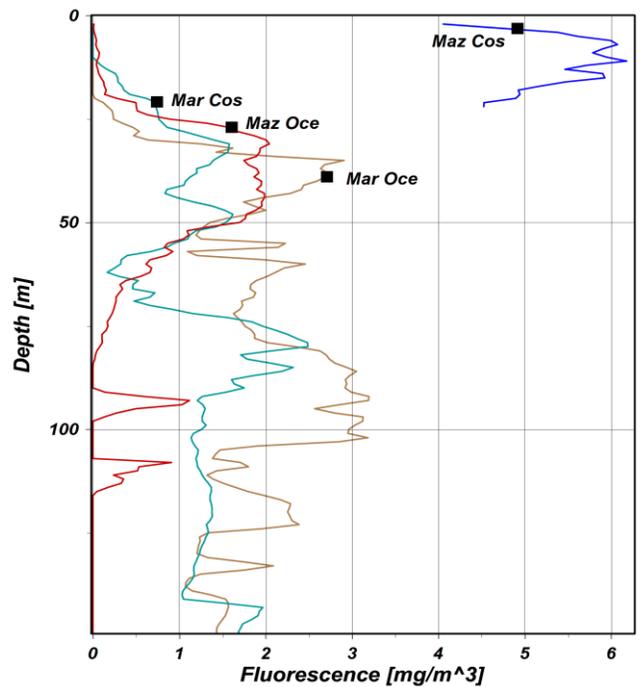
menor en las estaciones costeras (22 m *Maz Cos* y 45 m en *Mar Cos*) que en las oceánicas (55 m en *Mar Oce* y 85 m *Maz Oce*).

Figura 9. Perfil de concentración de oxígeno en mg/L.



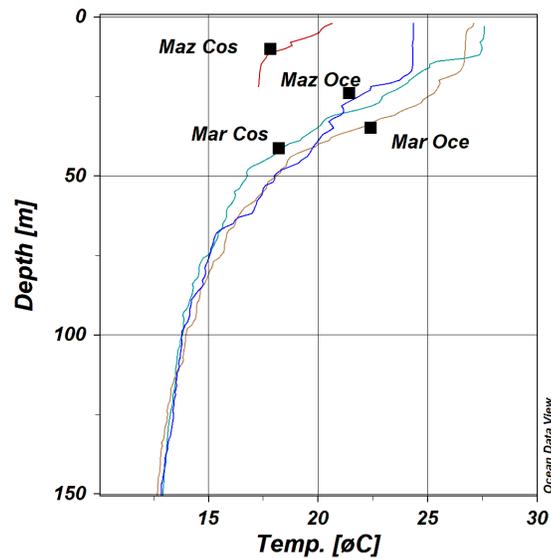
El perfil de clorofila a en las estaciones muestra que su concentración comenzó a aumentar después de los 20 m de profundidad hasta alcanzar el PMC, el cual se presentó alrededor de los 35-45 m de profundidad (Figura 10). Este PMC indica una alta productividad a esta profundidad, producida por una alta abundancia de microorganismos fotoautótrofos. Sin embargo, en la estación *Maz Cos*, el PMC fue más intenso y se encontró cerca de los 10 m, ya que se trata de una estación costera con una profundidad más somera y que se encuentra más eutrofizada que el resto de las estaciones por estar cercana a un asentamiento urbano (Puerto de Mazatlán). A mayores profundidades en las estaciones de Maruata se observaron picos con altas concentraciones de clorofila a, lo que indica alta abundancia de microorganismos fotoautótrofos en dichas profundidades.

Figura 10. Perfil de concentración clorofila a por fluorescencia en mg/m^3 .



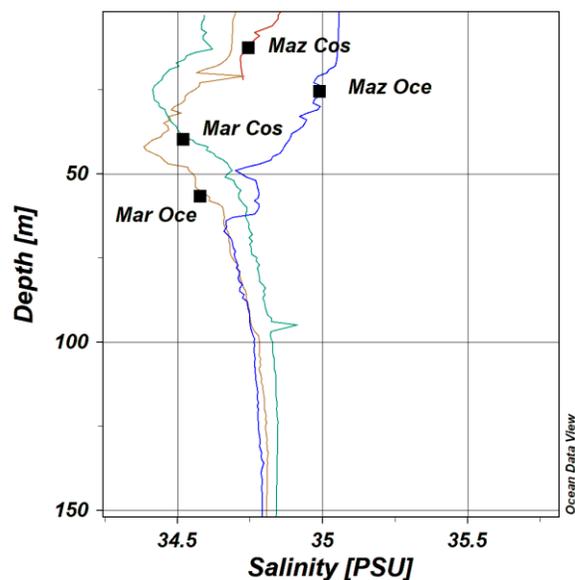
Las aguas de la estación *Maz Cos* fueron al menos 4 °C más frías que el resto de las estaciones, las cuales mostraron un comportamiento más similar entre sí (Figura 11). Las estaciones de Maruata tuvieron una temperatura superficial en torno a 27 °C, mientras que las de Mazatlán fueron de 24°C para *Maz Oce* y de 21 °C para *Maz Cos*. La temperatura mínima de *Maz Cos* se alcanzó en el fondo y fue de 17.5 °C, mientras que en las otras estaciones la temperatura mínima fue de 13 °C en la última profundidad muestreada (150 m).

Figura 11. Perfil de temperatura de las estaciones muestreadas.



La salinidad es un parámetro que refleja la cantidad de nutrientes presentes en el agua. En el perfil obtenido se observa que la salinidad en la zona eufótica fue mayor en las estaciones de Mazatlán, siendo *Maz Oce* la que tuvo valores mayores de salinidad (en torno a 34.8-35.1 PSU) con respecto a las demás estaciones (con valores en torno a 34.4-34.8 PSU). Sin embargo, todos los perfiles presentaron un comportamiento similar, en donde la salinidad disminuyó con la profundidad hasta los 40 a 50 m para volver a incrementar nuevamente hasta alcanzar valores de 34.8 PSU a 150 m de profundidad (Figura 12).

Figura 12. Perfil de salinidad de las estaciones muestreadas.

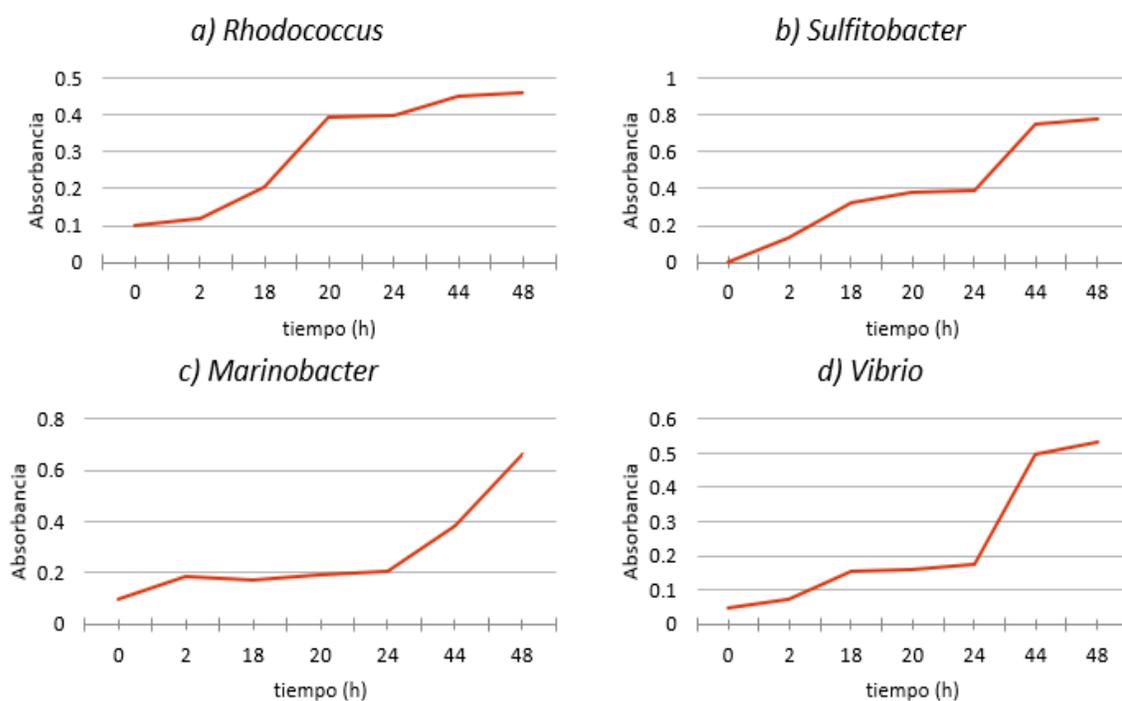


VIII.2 Estimación de la curva del crecimiento bacteriano por densidad óptica

Las cepas bacterianas con las que se trabajó son de crecimiento rápido, sin embargo, era preciso cuantificar la fase exponencial de su desarrollo, ya que es el periodo en el que las células están proliferando más rápidamente, siendo el momento más favorable para la infección viral.

Las cepas *Marinobacter*, *Sulfitobacter* y *Vibrio* alcanzaron la fase exponencial después de las 24 h de cultivo, mientras que *Rhodococcus* la alcanzó a las 18 h (Figura 13). Por ello, se eligió el tiempo de incubación de 24 h para realizar todos los ensayos posteriores.

Figura 13. Determinación de las curvas de crecimiento de las cepas: a) *Rhodococcus*, b) *Sulfitobacter*, c) *Marinobacter* y d) *Vibrio*.



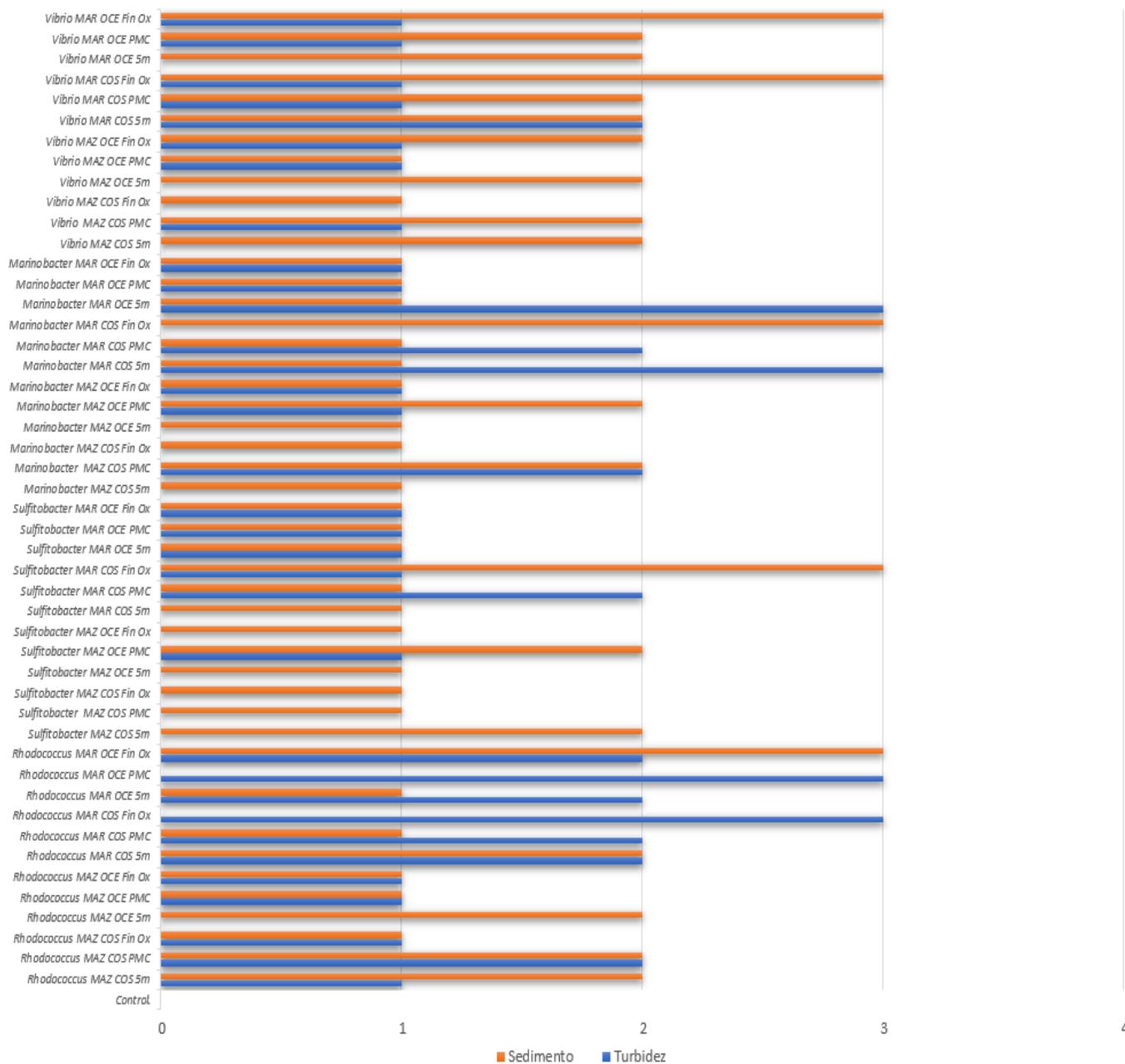
VIII.3 Ensayos de infección

Se inocularon las cuatro cepas bacterianas por duplicado con agua procedente de las cuatro estaciones a tres distintas profundidades y su respectivo control negativo. Se realizaron un total de 96 ensayos en los que se pudo distinguir diferentes intensidades de turbidez en el medio de cultivo, así como el sedimento que permaneció sin suspender aún después de agitar vigorosamente el tubo y dejar reposar por unos minutos a que se asentara. Además, se comprobó que el uso de cloroformo no fue un factor determinante, ya que no se apreció diferencia en los cultivos inoculados con muestras de agua con y sin cloroformo.

Un resultado interesante fue en aquellos ensayos pertenecientes a las muestras de *Mar Cos 5 m* en *Sulfitobacter* y *Mar Oce PMC* en *Rhodococcus*, donde el desarrollo bacteriano fue escaso tras inocular la muestra de agua, ya que hubo nulo o muy poco incremento de la turbidez. Esta característica es propia del incremento de la cantidad de bacterias en un caldo de cultivo. A pesar de esto, en el tubo de *Mar Cos 5 m* en *Sulfitobacter* se logró observar la acumulación de sedimento en el fondo del tubo (puntaje de 1). Este resultado podría indicar que la infección viral fue sumamente efectiva y evitó el desarrollo bacteriano.

Por otro lado, hubo varias muestras (la mayoría de ellas ensayadas con *Sulfitobacter*) que presentaron puntajes de 1, lo cual indica que no hubo pérdida de turbidez ni acumulación de sedimento en el fondo del tubo por muerte celular (Figura 14). Sin embargo, *Sulfitobacter* también mostró interacción con algunas de las muestras. La muestra *Mar Cos* en el FinOx mostró una notable formación de sedimento (puntaje de 4). Sin embargo, fue la cepa que mostró resultados de lisis más bajos. Cinco de las 12 pruebas realizadas en *Sulfitobacter* obtuvieron un puntaje de 1, indicado que esta cepa fue más resistente a la lisis viral que las otras cepas ensayadas.

Figura 14. Resultados de puntuación de lisis tras la exposición a las muestras de agua.



Los resultados de la lisis bacteriana por formación de sedimento y pérdida de turbidez fueron muy variados en las otras cepas ensayadas. Por ejemplo, *Vibrio* obtuvo los índices de lisis más altos con las muestras del FinOx de las estaciones costeras y oceánicas de Maruata y la perteneciente a los 5 m de *Mar Oce*, (puntaje de 4). El resto de las muestras ensayadas con *Vibrio*

arrojaron índices bajos, provenientes en su mayoría de la formación de sedimento.

Por otro lado, *Marinobacter* tuvo los puntajes más altos con las estaciones *Mar Oce* y *Mar Cos* a 5 m de profundidad, estas muestras registraron una pérdida de turbidez importante. En cambio, *Maz Cos* en el PMC, la otra estación que obtuvo un puntaje alto, se debió a una mayor formación de sedimento.

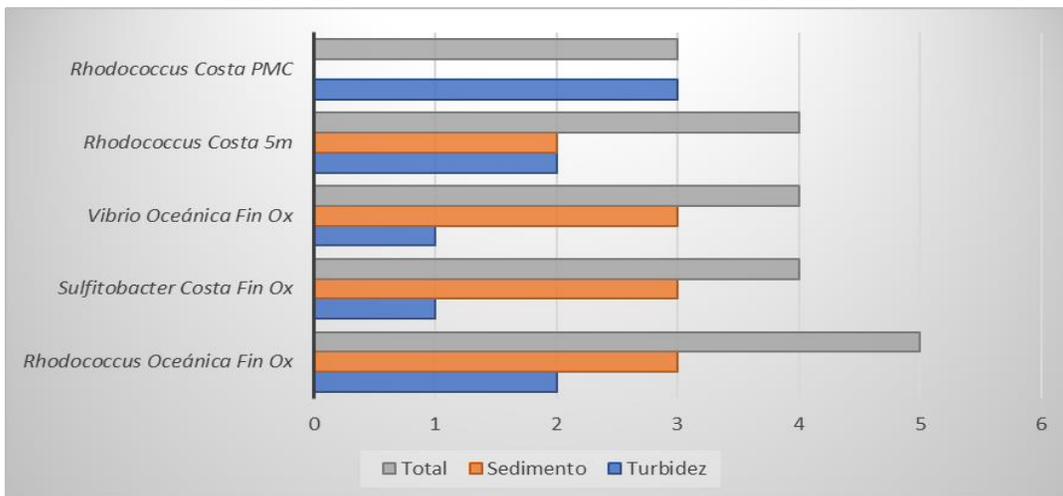
En general, *Rhodococcus* fue la cepa que mostró mayor índice de infección en las muestras ensayadas, ya que todos los ensayos con esta cepa dieron puntajes iguales o mayores a 2. Las muestras ensayadas con esta cepa que dieron un puntaje de 2 pertenecieron a las estaciones de Mazatlán; por lo que quedaron descartadas para los ensayos subsecuentes. Todos los demás ensayos de infección con esta cepa dieron puntajes altos (de 3 a 5), destacando la muestra de FinOx de *Mar Oce*, con un puntaje de 5. Esta última fue la muestra con mayor puntaje de todas y con la que se decidió trabajar en los ensayos posteriores por ser el mejor ejemplo de lo que se buscaba con esta metodología. También destacan aquellas muestras pertenecientes a *Mar Cos* en las profundidades de 5 m y en el PMC, las cuales tuvieron un puntaje de 3, el cual fue otorgado únicamente por la pérdida de turbidez, ya que no hubo formación de sedimento

De todas las muestras inoculadas en *Vibrio* únicamente una (*Maz Cos* FinOx) presentó un puntaje mínimo (1), mientras que las de mayor puntaje no superaron el valor de 4 (*Mar Cos* 5m, *Mar Cos* FinOx y *Mar Oce* FinOx). De acuerdo a estos resultados se podría decir que *Vibrio* fue la segunda cepa que más infección mostró, seguida de *Marinobacter*, la cual no tuvo interacción notable con las muestras de Mazatlán, con excepción del PMC de *Maz Cos*. Sin embargo, se puede apreciar un puntaje alto en las muestras de de Maruata, aunque ninguno fue particularmente destacado. La mayor parte del puntaje fue otorgado por la formación de sedimento.

Por último, las estaciones costeras mostraron mayor índice de infección que las oceánicas. En cuanto a las profundidades ensayadas, en general, las del FinOx fueron las que mostraron un mayor índice de infección.

Se seleccionaron las cinco muestras de agua y las cepas que presentaron los ensayos con mayor puntaje de lisis (Figura 15). Todas las muestras pertenecieron a las estaciones de Maruata: las tres profundidades de la costa y el FinOx de la estación oceánica. En cuanto a las cepas, tres pertenecieron a *Rhodococcus*, una a *Vibrio* y otra a *Sulfitobacter*. El resultado de *Mar Cos* del PMC no destacó por un puntaje alto, pero fue el que presentó la mayor pérdida de turbidez de todos los ensayos.

Figura 15. Muestras con mayor puntaje de lisis (muestras de Maruata).

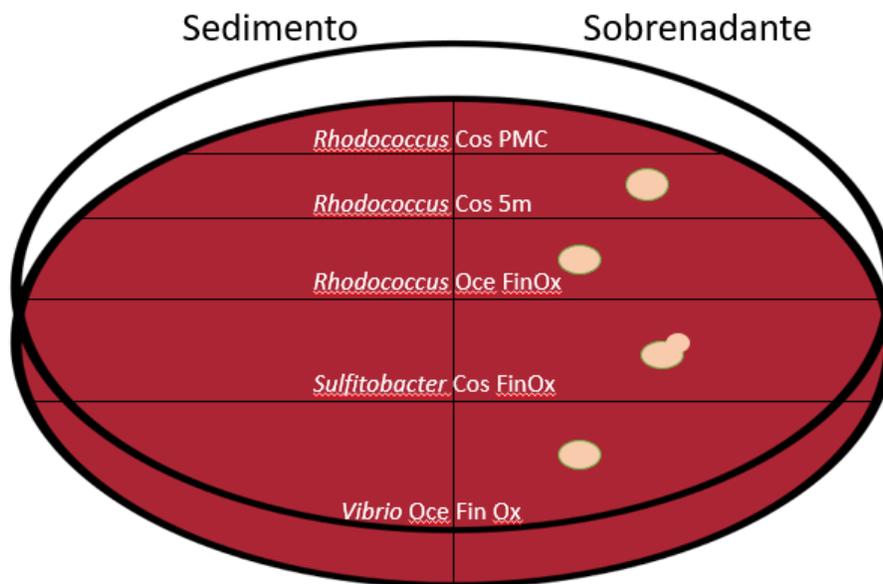


VIII.4 Ensayo de viabilidad

De las cinco muestras de agua seleccionadas por su alto índice de infección (todas de la estación Maruata), las pertenecientes al FinOx de las cepas *Vibrio*, *Sulfitobacter* y *Rhodococcus* y a la superficie (5 m) de *Rhodococcus* fueron consistentes con los ensayos pasados, ya que ocurrió una lisis de las bacterias y la formación de sedimento, el cual al cultivarse en una caja Petri no generaron colonias (Figura 16). Sin embargo, sí hubo colonias a partir del sobrenadante de dichos ensayos.

La muestra que no registró crecimiento a partir del sobrenadante ni del sedimento fue la perteneciente al PMC de la estación *Mar Cos* en la cepa *Rhodococcus*.

Figura 16. Ensayo de viabilidad tras infección.



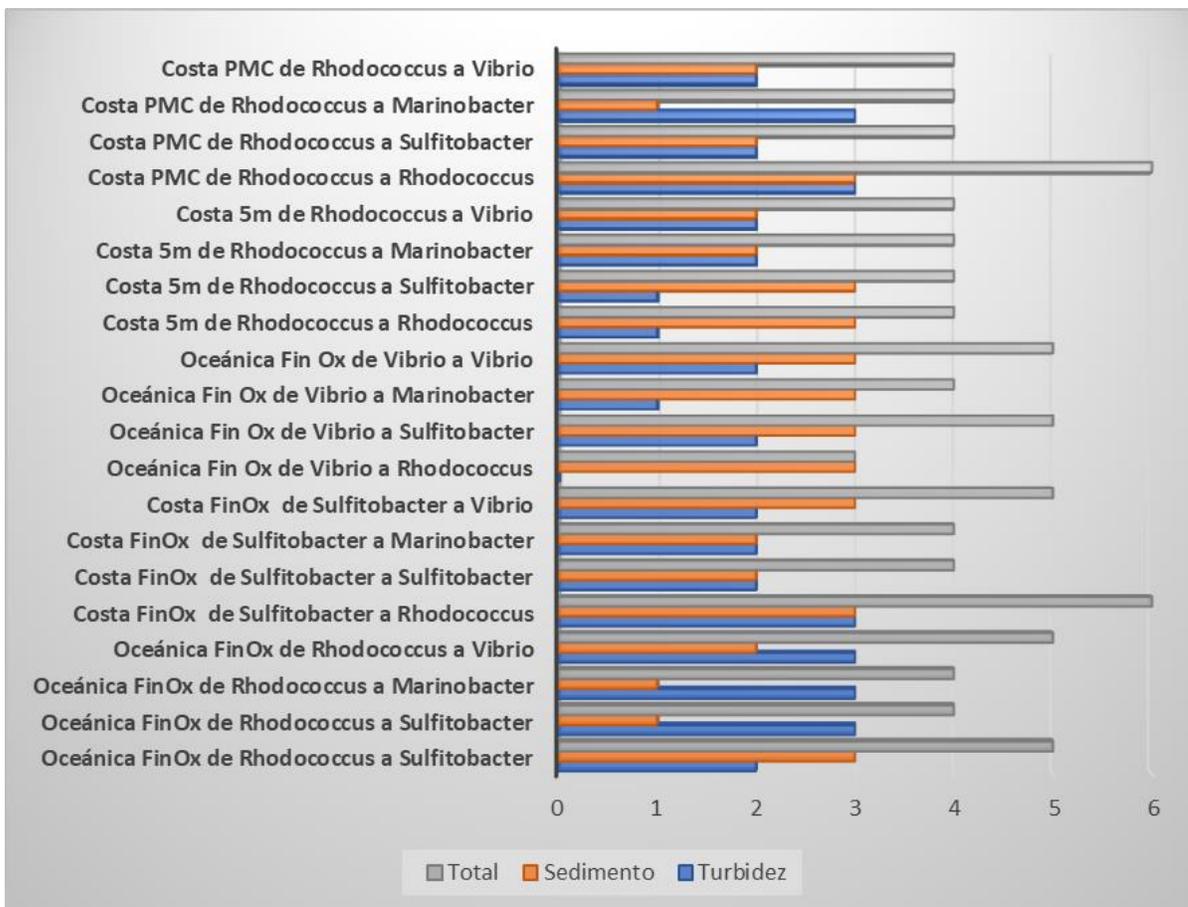
VIII.5 Ensayos de infección cruzada

Las pruebas de infección cruzada se realizaron con las muestras de mayor puntaje de lisis del ensayo de infección, que fueron las mismas que se usaron para los ensayos de viabilidad (Figuras 15 y 16).

En este ensayo hubo dos muestras que alcanzaron el máximo puntaje de 6 (Figura 17). La primera perteneció al PMC de *Mar Cos*, la cual obtuvo una puntuación de 6 al infectar nuevamente a la misma cepa hospedero (*Rhodococcus*). La segunda perteneció al sobrenadante recuperado de *Mar Cos* FinOx en *Sulfitobacter*, que al infectar a *Rhodococcus* obtuvo un puntaje máximo de 6.

Figura 17. Ensayos de infección cruzada.

Las muestras que presentaron mayor puntaje de infección fueron inoculadas nuevamente en cada una de las cuatro cepas.



Todos los puntajes en este ensayo fueron altos (iguales o mayores a 4), con la excepción del perteneciente a *Mar Oce* en el FinOx de *Vibrio* a *Rhodococcus*, con un puntaje de 3. Esto indicaría que hubo una propagación de los virus presentes en las muestras de agua recolectadas en el Pacífico Mexicano.

VIII.6 Titulación viral

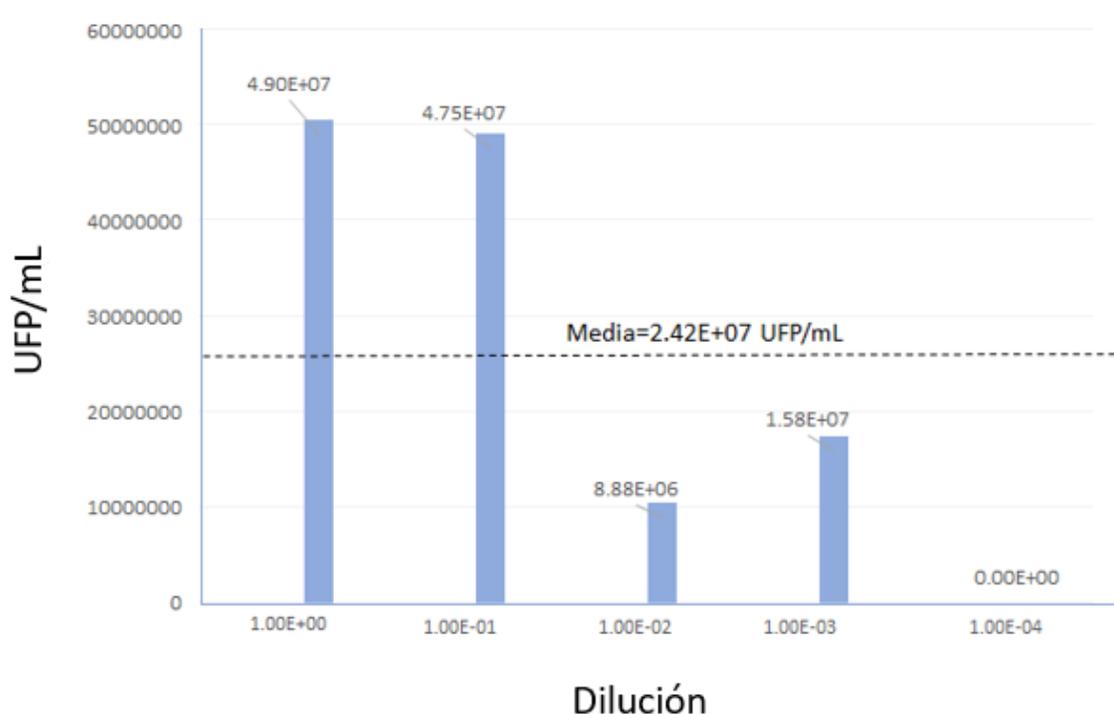
Por medio del ensayo en placa se realizó el conteo de halos de lisis para realizar la estimación de UFP/mL, el cual se realizó dos veces consecutivas a

partir de la muestra del PMC de *Mar Cos* con *Rhodococcus*, dado que fue la que mayor lisis mostró tras todos los ensayos previos.

En el primer ensayo, la titulación viral tuvo un valor de 1.76×10^4 UFP/mL, el cual es un número muy bajo de partículas infectivas y se decidió realizarlo una vez más tras un segundo pase para propagar los fagos obtenidos en el primer ensayo.

En el segundo pase el título viral fue del orden de 2.42×10^7 UFP/mL (Figura 18), el cual se encuentra dentro del rango esperado para muestras marinas. Además, en este segundo pase hubo un incremento de 3 órdenes de magnitud con respecto al primer pase, por lo que se puede suponer que hubo una propagación de los bacteriófagos en las muestras de agua del Pacífico Tropical mexicano. Por otro lado, en las diluciones seriadas a partir de 10^{-2} disminuyeron los halos de lisis hasta 10^{-4} , en la cual ya no se apreciaron halos de lisis bacteriana en la placa de agar.

Figura 18. Cantidad estimada de partículas virales en la muestra de agua más infectiva.



IX. Discusión

En este trabajo se busca comprobar la presencia e interacción de los bacteriófagos del Pacífico mexicano con sus hospederos bacterianos. Asimismo, se busca conocer la influencia que tienen los parámetros fisicoquímicos (concentración de oxígeno disuelto, concentración de clorofila, temperatura y salinidad) de esta zona oceánica en la distribución y capacidad de infección de los bacteriófagos presentes en las muestras recolectadas en cuatro cepas bacterianas aisladas en la misma zona de estudio.

Las cuatro cepas ensayadas se eligieron por ser bacterias heterótrofas típicas de sistemas marinos, que son de fácil cultivo y pueden crecer en presencia de oxígeno y con concentraciones altas de salinidad (Bowman y McMeekin, 2015; Helmke y Weyland, 1984; Leyton y Riquelme, 2015; Long et al. 2011). De estas cepas, *Sulfitobacter* y *Rhodococcus* se aislaron en la parte superficial del océano y el PMC y *Vibrio* y *Marinobacter* en el PMC y FinOx (Guzmán, 2018). Por lo tanto, estas cepas bacterianas tienen una alta probabilidad de encontrarse en las estaciones y profundidades muestreadas y, con ellas, los bacteriófagos correspondientes. Sin embargo, cada cepa tiene preferencias nutrimentales de acuerdo con su metabolismo, así como distintos requerimientos de concentración de oxígeno, temperatura, salinidad y fuentes de carbono.

Sulfitobacter es una Proteobacteria aerobia especializada en la oxidación de sulfito que ha sido en diversas partes del océano, desde la Antártida, hasta el Mar Mediterráneo (Long et al., 2011). Por lo tanto, se considera una bacteria marina cosmopolita. *Rhodococcus* es una Actinobacteria aerobia con una gran diversidad genética y catabólica, que se encuentra en el océano, suelo y el aire (Helmke y Weyland, 1984). En cambio, *Vibrio* y *Marinobacter* son Proteobacterias aerobias facultativas que pueden usar nitrato como aceptor de electrones en condiciones anaerobias (Bowman y McMeekin, 2015; Leyton y Riquelme, 2015).

Los requerimientos de oxígeno de cada cepa bacteriana son diferentes, por lo que la distribución de éstas y, por lo tanto, de los fagos capaces de infectarlas (dado que la proliferación de los fagos depende del hospedero), también se verá afectada por la disponibilidad de oxígeno a lo largo de la columna de agua. Los perfiles de oxígeno disuelto de las estaciones muestreadas demuestran que existe una zona en la que el oxígeno alcanza concentraciones tan bajas como 0.1 μM . Esta tendencia persiste desde el FinOx, aproximadamente entre 50 y 80 m, hasta pasados los 1000 m de profundidad (datos no mostrados). Esto nos indica la presencia de una ZMO de gran extensión en la que el oxígeno es deficiente, por lo que muchas especies aerobias no pueden habitar aquí (Cepeda-Morales et al., 2009). De hecho, *Vibrio* es un género anaerobio facultativo (Thompson et al., 2004) que registró susceptibilidad notable a los fagos presentes en las muestras del FinOx. Sin embargo, está el caso de *Marinobacter*, que es un género anaerobio facultativo (Bowman y McMeekin, 2015; Gauthier et al., 1992), el cual mostró mayor susceptibilidad a la infección viral por las muestras tomadas a los 5 m de profundidad.

La temperatura también influye en la distribución de las bacterias y, por tanto, de los fagos. La actividad enzimática de los microorganismos depende de la temperatura del medio al que se encuentran y por tanto, la capacidad de un virus que está infectando de poderse reproducir. Las condiciones ideales para el cultivo de estas cepas son entre 20 y 45°C y en presencia de oxígeno (Bowman y McMeekin, 2015; Helmke y Weyland, 1984; Martínez et al., 2010). Por lo que, de acuerdo con los perfiles de temperatura obtenidos en las estaciones de estudio y a las profundidades donde fueron aisladas estas bacterias, estas cepas podrían desarrollarse mejor en todas las estaciones hasta una profundidad máxima aproximada de 35 a 40 m, que es donde la temperatura comienza a descender por debajo de los 20°C y es donde se encuentran la mayoría de los PMC de cada estación. Por lo tanto, podría ser un nicho adecuado donde estas bacterias

podrían desarrollarse y, junto con ella, los bacteriófagos que puedan infectarlas.

La concentración de clorofila *a* y salinidad son parámetros que se relacionan con la productividad (la cantidad de materia orgánica que los microorganismos autótrofos están produciendo) y la cantidad de nutrientes, respectivamente. A excepción de la estación *Maz Cos* (la más somera), los PMC y los menores valores de salinidad se producen en las mismas profundidades en las estaciones muestreadas, lo que indicaría que estas profundidades son de mayor productividad y con menor concentración de nutrientes. A pesar de que hay pocos nutrientes, hay una enorme cantidad de microorganismos autótrofos y heterótrofos habitando esta zona y, por tanto de bacteriófagos (Finke et al., 2017; Johannessen et al., 2017). Esto puede deberse a la deriva viral, que fomenta un reciclaje de la materia orgánica, la cual puede ser aprovechada por los organismos heterótrofos. En general, la densidad viral aumenta con la productividad del sistema (Maranger y Bird, 1995), por lo que se espera que, en las zonas más productivas, como es la estación *Maz Cos* y las profundidades asociadas al PMC, sean donde predominen los bacteriófagos y, por tanto, sean las que presenten índices de lisis más altos.

En general las muestras pertenecientes a la superficie (5 m) mostraron índices de lisis menores en las bacterias ensayadas con respecto a las otras dos profundidades de muestreo, siendo *Mar Cos* la que mostró mayor lisis. Las aguas costeras contienen una mayor cantidad de nutrientes, por lo que se espera que haya mayor abundancia de bacterias que estén expuestas a la infección viral. Cabe mencionar que los fagos en esta profundidad se encuentran sometidos a una alta radiación UV de los rayos solares. La radiación tiene un impacto directo en los ácidos nucleicos provocando mutaciones (Clokic et al., 2011), por lo que en la superficie oceánica se espera encontrar menor abundancia de bacterias y, por tanto, de

bacteriófagos, como se puede deducir de los ensayos de infección realizado en este estudio.

Un fenómeno interesante que ocurre en algunas algas unicelulares marinas es la aparente protección que brindan los virus a sus hospederos ante la radiación UV (Jacquet y Bratbak, 2003), optando así por el ciclo lisogénico en vez del lítico. De igual forma, se ha observado que la lisis por virus es menor en ambientes oligotróficos (Vaqué, et al., 2014) Por lo tanto, los menores índices de infección encontrados en las muestras superficiales en relación a las muestras del PMC y FinOx son coherentes con lo esperado.

En los ensayos de infección, *Rhodococcus* fue la que tuvo puntajes más altos, seguido de *Vibrio*. Por lo tanto, *Rhodococcus* fue la cepa más susceptible a la infección. *Rhodococcus* pertenece al orden de los Actinomycetales, los cuales son muy diversos y muchas especies se encuentran en el océano (Jensen, et al., 2005), por lo que es de esperarse que haya una gran cantidad de fagos capaces de infectarla. Además, muchas de las proteínas de membrana entre las bacterias de este orden son muy similares y éstas son las responsables del reconocimiento de superficie necesario para la infección (Summer et al., 2011).

Las muestras que mayor infección mostraron con *Rhodococcus* fueron las pertenecientes a 5 m y PMC de la estación *Mar Cos*, lo cual es un resultado esperado porque se trata de un género aerobio. Además, esta estación presenta condiciones diferentes en cuanto a concentración de oxígeno disuelto, temperatura y salinidad con respecto a las otras tres estaciones, por lo que podría tratarse de una estación con condiciones óptimas para el desarrollo microbiano y, por tanto, de bacteriófagos a lo largo de la columna de agua. Tras los ensayos de infección cruzada, los índices en las muestras del segundo pase en *Rhodococcus* también fueron altos. En todos ellos aumentó el puntaje con respecto al ensayo anterior, incluso llegando a obtener una máxima puntuación en el índice de lisis.

Al realizarse la prueba de viabilidad en la muestra del PMC de *Mar Cos* en *Rhodococcus*, no se obtuvo desarrollo del sedimento ni del sobrenadante, lo cual indica que hubo muerte celular por lisis viral muy efectiva. Por lo tanto, a partir de esta muestra se decidió realizar la estimación de partículas virales presentes en dicha muestra. El ensayo de titulación viral se realizó en dos pases. El primer pase dio un resultado del orden de 10^4 UFP/mL, mientras que en el segundo se obtuvo un promedio de 2.42×10^7 UFP/mL, lo cual indica que hubo una propagación de los fagos de la muestra en tres órdenes de magnitud. De acuerdo con Zemb et al. (2008), a partir de muestras marinas se esperan obtener cuantificaciones del orden entre 10^5 y 10^{10} UFP/mL, por tanto, los valores obtenidos de partículas virales en una muestra de agua del Pacífico mexicano están en el rango esperado. De hecho, en ambientes marinos, costeros y en aguas superficiales se han encontrados valores de 10^7 UFP/mL, mientras que, en ambientes marinos más eutrofizados, como los estuarios, se alcanzan valores de 10^8 UFP/mL (Maranger y Bird, 1995; Paul, 2000). Utilizando técnicas de microscopía por epifluorescencia, se han reportado valores de abundancia viral desde 10^6 virus/mL en el océano abierto hasta 10^8 virus/mL en regiones cercanas a la costa (Fuhrman y Suttle, 1993; Hara et al., 1991).

Donde sea que haya células vivas, existirán virus para depredarlas, por lo tanto, se espera que donde haya mayor cantidad y diversidad de bacterias también haya mayor cantidad de bacteriófagos y con mayor capacidad infectiva. Investigaciones recientes en la misma región de estudio han demostrado que el FinOx es un nicho favorable para el desarrollo de una gran diversidad de bacterias con diferentes capacidades metabólicas (Pajares et al., 2019). De acuerdo con los resultados obtenidos en los dos ensayos de infección, el lugar con mayores índices de infección en las cepas bacterianas heterótrofas ensayadas fue el FinOx de *Mar Oce*, por lo que se podría inferir que en esta zona es donde se localizaría la mayor cantidad y diversidad de bacteriófagos.

Finalmente, se sugiere profundizar en este tipo de estudios usando métodos que combinen técnicas moleculares con microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo, los cuales permitan una mejor aproximación en la estimación de la abundancia y dinámica de los bacteriófagos que habitan en las ZMOs.

X. CONCLUSIONES

- Las cuatro cepas bacterianas heteótrofas ensayadas fueron infectadas por todas las muestras recolectadas en diferentes zonas y profundidades del Pacífico mexicano, aunque las cepas mostraron diferentes grados de susceptibilidad a la infección.
- Los fagos de las muestras provenientes de la costa tuvieron una mayor capacidad infectiva en las cepas bacterianas ensayadas, principalmente en *Rhodococcus*. Por el contrario, *Sulfitobacter* fue la cepa menos susceptible a la infección por los fagos en estas muestras.
- La profundidad que mostró mayor capacidad infectiva en los ensayos realizados fue el FinOx, el cual es un nicho de biodiversidad muy importante. Sin embargo, la infección más contundente ocurrió con las muestras del PMC de la estación costera de Maruata en *Rhodococcus*.
- Se estimó que la cantidad de partículas virales provenientes de la profundidad del primer máximo de clorofila (PMC) en la estación costera de Maruata capaces de infectar a la cepa *Rhodococcus* fue de 2.42×10^7 UFP/mL.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of Virology*. 146 (5): 843-57.
- Alonso, C., Rodríguez, J., Borrego, J. J. (2002). Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Journal of Plankton Research*. 24 (10): 1079-1097.
- Anderson, T. R., Ducklow, H. W. (2013). Microbial loop carbon cycling in ocean environments studied using a simple steady-state model. *Aquatic Microbial Ecology*. 26 (1): 37-49.
- Bowman, J., McMeekin, T. (2015). *Marinobacter*. En: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc. Bergey's Manual Trust. EUA. p. 193.
- Breitbart, M. (2012). Marine Viruses: Truth or Dare. *Annual Review of Marine Science*. 4 (1): 425–448.
- Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., Sawaya, N. A. (2018). Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nature Microbiology*. 3 (7): 754–766
- Brussaard, C. (2009). Enumeration of Bacteriophages Using Flow Cytometry. En: *Methods in Molecular Biology* 501. Ed. Walker, John M. Humana Press, EUA. pp. 97-111.
- Brussaard, C., Kuipers B., Veldhuis, M. (2005). A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics: I. Regulatory role of viruses in bloom control. *Harmful Algae*. 4: 859–874.
- Casey, E., Sinderen, D., Van Mahony, J. (2018). In Vitro Characteristics of Phages to Guide 'Real Life' Phage Therapy Suitability. *Viruses*. 10 (4): 163.
- Cassman, Prieto-Davó, A., Walsh, K., Silva, G., Angly, F., Akhter, S., Barott, K., Busch, J., McDole, T., Haggerty, J., Willner, D., Alarcón, G., Ulloa, O., DeLong, E., Dutilh, B., Rohwer, F., Dinsdale E. (2012). Oxygen minimum zones harbour novel viral communities with low diversity. *Environmental Microbiology*. 14 (11): 3043-65.

- Cepeda-Morales, J., Beier, E., Gaxiola-Castro, G., Lavín, M. F., Godínez, V. M. (2009). Efecto de la zona del mínimo de oxígeno en el segundo máximo de clorofila en el Pacífico Oriental Tropical Mexicano. *Ciencias Marinas*. 35 (4): 389–403.
- Clokier, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., Heaphy, S. (2011). Phages in nature, *Bacteriophage*. 1 (1): 31–45.
- Codispoti, L., Brandes, J., P. Christensen, J., Devol, A., Naqvi, S., Paerl, H., Yoshinari, T. (2000). The Oceanic Fixed Nitrogen and Nitrous Oxide Budgets: Moving Targets as We Enter the Anthropocene?. *Scientia Marina*. 65 (2): 10.3989.
- Danovaro, R., Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Fuhrman, J. A., Middelburg, J. J., Noble, R. T., Suttle, C. A. (2011). Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiology Reviews*. 35 (6): 993–1034.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M. (2001). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*. 13 (4): 293–299.
- Derelle, E., Ferraz, C., Escande, M., Eychenie, S., Cooke, R., Piganeau, G., Desdevises, Y., Bellec, L., Moreau, H., Grimsley, N. (2008). Life-cycle and genome of OtV5, a large DNA virus of the pelagic marine unicellular green alga *Ostreococcus tauri*. *PLoS One*. 3 (5): e2250.
- Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). (Tesis Doctoral) Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina, p. 16
- Doney, S. C., Ruckelshaus, M., J., Barry, J. P., Chan, F., English, C. A., Galindo, H. M., Grebmeier, J. M., Hollowed, A. B., Knowlton, N. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science*. 4: 11–37.
- Dunn, S. W., Unit, M. (1961). The role of magnesium ions in the growth of *Salmonella* phage anti -R. *Journal of general Microbiology*. 26: 313-323.

- Finke, J. F., Hunt, B. P. V., Winter, C., Carmack, E. C., Suttle, C. A. (2017). Nutrients and other environmental factors influence virus abundances across oxic and hypoxic marine environments. *Viruses*. 9 (6): 1–15.
- Fiedler, P. C., Talley, L. D. (2006). Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*. 69 (2–4): 143–180.
- Flaviani, F., Schroeder, D. C., Balestreri, C., Schroeder, J. L., Moore, K., Paszkiewicz, K., Rybicki, E. P. (2017). A pelagic microbiome (viruses to protists) from a small cup of seawater. *Viruses*. 9 (3): PII: E47.
- Fuhrman, J., Suttle, C. (1993) Virus in marine planktonic systems. *Oceanography*. 6 (2): 51–63.
- Galvani, A. P. (2003). Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution*. 18 (3): 132–139.
- Gauthier, M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin, and J.-C. Bertrand. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42 (4): 568-76.
- Groman, N. B., Lockart, R. Z. (1953). A study of the application of standard phage techniques, *Journal of Bacteriology*. 66 (2): 178–183.
- Guzman, I. (2018). Diversidad y Actividad enzimática de bacterias heterótrofas cultivables del Pacífico Tropical Mexicano. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México, p. 54.
- Hanson, C. A., Marston, M. F., Martiny, J. B. H. (2016). Biogeographic variation in host range phenotypes and taxonomic composition of marine cyanophage isolates. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1–14.
- Hara, S., Terauchi, K., and Koike, I. (1991). Abundance of viruses in marine waters – assessment by epifluorescence and transmission electron-microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (9): 2731–2734.
- Haro-Moreno, J. M., Gonzalez-serrano, R., Parras, M., Lo, M. (2017). Genome diversity of marine phages recovered from Mediterranean metagenomes: Size matters, *PLoS Genetics*. 13 (9): 1–23.

- Harper, R., Burrowes, H., Kutter, M. (2014). *Bacteriophage: Therapeutic Uses*. eLS. John Wiley & Sons Ltd: Chichester.
- Helmke, E., Weyland, H. (1984). *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an Actinomycete from the Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34 (2): 127–138.
- Henderson, G. M. (2016). Ocean trace element cycles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. 374: 20150300.
- Jacquet, S. Å., Bratbak, G. (2003). Effects of ultraviolet radiation on marine virus-phytoplankton interactions. *FEMS Microbiology Ecology*. 44 (3): 279-89.
- Jayakumar, A., Naqvi, S., Ward, B. (2009). Distribution and Relative Quantification of Key Genes Involved in Fixed Nitrogen Loss From the Arabian Sea Oxygen Minimum Zone. En: *Indian Ocean biogeochemical processes and ecological variability*. Ed. Wiggert, J. D.; Hood, R. R., Naqvi, S., Brink, K. H., Smith, S. L. Geophysical Monograph Series. American Geophysical Union EUA. pp. 187–204.
- Johannessen, T., Larsen, A., Bratbak, G., Pagarete, A., Edvardsen, B., Egge, E. D., Sandaa, R. A. (2017). Seasonal dynamics of haptophytes and dsDNA algal viruses suggest complex virus-host relationship. *Viruses*. 9 (4): PII: E84.
- Jover, L. F., Effler, T. C., Buchan, A., Wilhelm, S. W., Weitz, J. S. (2014). The elemental composition of virus particles: Implications for marine biogeochemical cycles. *Nature Reviews Microbiology*. 12 (7): 519–528.
- Jun, J. W., Giri, S. S., Kim, H. J., Yun, S. K., Chi, C., Chai, J. Y., Park, S. C. (2016). Bacteriophage application to control the contaminated water with *Shigella*. *Scientific Reports*. 6: 22636.
- Kauffman, K. M., Hussain, F. A., Yang, J., Arevalo, P., Brown, J. M., Chang, W. Polz, M. F. (2018). Unrecognized killers of marine bacteria. *Nature*. 554, (7690): 118–122.
- Kalvelage, T., M. Jensen, M., Contreras, S., Revsbech, N. P., Lam, P., Günter, M., M. M. Kuypers, M. (2011). Oxygen sensitivity of anammox and coupled N-cycle processes in Oxygen Minimum Zones. *PLoS One*. 6(12): e29299.

- Jensen, P., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T., Fenical, W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology*. 7 (7):1039-48.
- Jiang, S. C., Paul, J. H. (1998). Gene transfer by transduction in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8): 2780–2787.
- Keen, E. C., Gables, C. (2016). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*. 37 (1): 6–9.
- Lalli, C., Parsons, T. (2006). Benthic Communities. En: *Biological Oceanography: An Introduction*. Ed. Butterworth-Heinemann. Elsevier. Canadá, pp. 196-243.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D. (2008). The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*. 455 (7209): 100-165.
- Leigh, B., Karrer, C., Cannon, J. P., Breitbart, M., Dishaw, L. J. (2017). Isolation and characterization of a *Shewanella* phage-host system from the gut of the tunicate, *Ciona intestinalis*. *Viruses*. 9 (3): PII: E60.
- Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43 (3): 441-456.
- Lindell, D., Jaffe J. D., Johnson Z., Church, G. M., Chisholm, S. (2005). Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*. 438 (7064): 86-9.
- Long, C., Lu, X., Gao, Y., Jiao, B., Liu, X. (2011). Description of a *Sulfitobacter* Strain and Its Extracellular Cyclodipeptides, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. *eCAM*, 2011: 393752.
- Luo, E., Aylward, F. O., Mende, D. R., Delong, E. F. (2017). Bacteriophage distributions and temporal variability in the ocean's interior. *mBio*. 8: e01903-17.
- Maina, A. N., Mwaura, F. B., Oyugi, J., Goulding, D., Toribio, A. L., Kariuki, S. (2014). Characterization of *Vibrio cholerae* bacteriophages isolated from the

- environmental waters of the Lake Victoria region of Kenya. *Current Microbiology*. 68 (1): 64–70.
- Malfatti, F., Diego, S. (2014). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews, Microbiology*. 5 (10): 782-791
- Mann, N., Cook, A., Millard, A., Bailey, S., Clokie, M. (2003). Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*. 424 (6950): 741-1.
- Marston, M. F., Taylor, S., Sme, N., Parsons, R. J., Noyes, T. J. E., Martiny, J. B. (2013). Marine cyanophages exhibit local and regional biogeography. *Environmental Microbiology*. 15 (5): 1452–1463.
- Maranger, R., Bird, D. (1995). Viral abundance in aquatic systems: A comparison between marine and fresh waters. *Marine Ecology Progress Series*. 121: 217-226.
- Marintcheva, B. (2018). *Viral Tools for Protein Expression and Purification*. En: *Harnessing the Power of Viruses 1st Edition*. Academic Press/Elsevier. EUA. pp. 103-131.
- Michelle, I. (2007). Nutrientes, oxígeno y procesos biogeoquímicos en el sistema de surgencias de la corriente de Humboldt frente a Perú. *Revista Peruana de Biología*. 14 (1): 117-128.
- Middelboe, M. (2010). Microbial disease in the sea: Effects of viruses on carbon and nutrient cycling. En: *Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems*. Ed. Ostfeld, R. Keesing, F., Eviner V., Princeton University Press, EUA. pp. 242-259.
- Middelboe, M., Brussaard, C. P. D. (2017). Marine viruses: Key players in marine ecosystems. *Viruses*. 9 (10): 1–6.
- Middelboe, M., Lyck, P. G. (2002). Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquatic Microbial Ecology*. 27 (2): 187–194.
- Mirzaei, M. K., Nilsson, A. S. (2015). Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS ONE*. 10 (3): 1–13.

- Nakajima, R., Yoshida, T., Haji, B., Ross, O., Toda, T. (2008). Diel variation in abundance, biomass and size composition of zooplankton community over a coral-reef in Redang Island Ecosystem. *Plankton and Benthos Research*. 3 (4): 216–226.
- NOAA. How deep is the ocean? National Ocean Service Website. <https://oceanservice.noaa.gov/facts/oceandepth.html>, 10/10/17.
- NOAA. How much water is in the ocean? National Ocean Service Website. <https://oceanservice.noaa.gov/facts/oceanwater.html>, 10/10/17.
- Onodera, K. (2009). Molecular biology and biotechnology of bacteriophage. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 119: 17-43.
- Paul, H., Kellogg, C., (2000). Ecology of Bacteriophages in Nature. En: *Viral Ecology*. Ed. Hurst, C. Academic Press. EUA. pp. 211-246
- Pajares, S., Varona-Cordero F., Hernández-Becerril D. (2019). Biogeographic patterns of bacterioplankton in the oxygen minimum zone of the Tropical Mexican Pacific. *Sometido a Limnology and Oceanographic*.
- Paulmier, A., Ruiz-Pino, D. (2008). Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean. *Progress in Oceanography*. 80: 113–128.
- Perez Sepulveda, B., Redgwell, T., Rihtman, B., Pitt, F., Scanlan, D. J., Millard, A. (2016). Marine phage genomics: The tip of the iceberg. *FEMS Microbiology Letters*. 363 (15): 1–8.
- Prada-Peñaranda, C., Holguín-Moreno, A., González-Barrios, A., Vives-Flores, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia, Universitas Scientiarum*. 20 (1): 43–59.
- Roh, S. W., Quan, Z., Nam, Y., Chang, H., Kim, K., Rhee, S., Bae, J. (2018). *Marinobacter goseongensis* sp. nov., from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 2866–2870.
- Rückert, G. Von, Giani, A. (2004). Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). *Brazilian Journal of Botany*. 27 (2): 325–331.

- Seed, K. D. (2015). Battling Phages: How bacteria defend against viral attack. *PLoS Pathogens*. 11 (6): e1004847.
- Stewart, G., Carlson, A. (1986) The biology of natural transformation. *Annual Review of Microbiology*. 40: 211-231.
- Sullivan, M. B., Waterbury, J. B., Chisholm, S. (2003). Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*. 424 (6952): 1047-51.
- Summer, E., Liu, M., Gill, J., Grant, M., Ferguson, L., Janes, C., Young, R. (2011). Genomic and Functional Analyses of *Rhodococcus equi* Phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7. *Applied Environmental Microbiology*. 77 (2): 669–683.
- Suttle, C. A. (2007). Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nature Reviews. Microbiology*. 5 (10): 801–812.
- Thompson, F. L., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68 (3): 403–431.
- Ulloa, O., Canfield, D.E., DeLong, E.F., Letelier, R.M., Stewart, F.J. (2012). Microbial oceanography of anoxic oxygen minimum zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (40): 15996–16003.
- Vaqué, D., Sà, E. L., Lara, E., Acinas, S. G. (2014). Viruses and Their Role in the Ocean: Bacteriophages and Bacteria Interactions. En: *Extended Abstracts Spring 2013. Trends in Mathematics*, vol 2. Ed. Corral, Á., Deluca, A., Font-Clos, F., Guerrero, P., Korobeinikov, A., Massucci, F. Birkhäuser, Cham. Suiza, pp. 127-130.
- Vilas Boas, D., Almeida C., Sillankorva, S., Nicolau, A., Azeredo J., Azevedo, N. (2016). Discrimination of bacteriophage infected cells using locked nucleic acid fluorescent in situ hybridization (LNA-FISH). *Biofouling*. 32 (2): 179-190.
- Voss, M., Bange, H. W., Dippner, J. W., Middelburg, J. J., Montoya, J. P., Ward, B. (2013). The marine nitrogen cycle: recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*. 368 (1621): 20130121.
- Wells, L., Deming, J., (2006). Characterization of a cold-active bacteriophage on two psychrophilic marine hosts. *Aquatic Microbial Ecology*. (45): 15-29.

- Weinbauer, M., Hornák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Dolan, J., Šimek, K. (2007). Synergistic and antagonistic effects of viral lysis and protistan grazing on bacterial biomass, production and diversity. *Environmental Microbiology*. 9 (3): 777-788.
- Weitz, J., Wilhelm, S. (2012). Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *F1000 Biology Reports*. 8: 2–9.
- Weitz, J., Wilhelm, S. (2014). An Ocean of Viruses, *The Scientist Magazine*. 8: 1–8.
- Young, R. (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews*. 56 (3): 430–481.
- Wiebinga, C. J., Veldhuis, M. J. W., De-Baar, H. J. W. (1997). Abundance and productivity of bacterioplankton in relation to seasonal upwelling in the northwest Indian Ocean. *Deep Sea Research*. 14: 451-476.
- Wilhelm, S. W., Suttle, C. A. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea - viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience*. 49 (10): 781-8.
- Wommack, K., Colwell, R. (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 (1): 69-113.
- Wright, J.J., Konwar, K.M., Hallam, S.J., (2012). Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nature Reviews*. 10: 381–394.
- Zeaiter, Z., Mapelli, F., Crotti, E., Borin, S. (2018). Methods for the genetic manipulation of marine bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*. 33: 17–28.
- Zemb, O., Urios, L., Coetsier, C., Lebaron, P. (2008). Efficient method to isolate and purify viruses of bacteria from marine environments. *Letters in Applied Microbiology*. 47 (1): 41–45.

