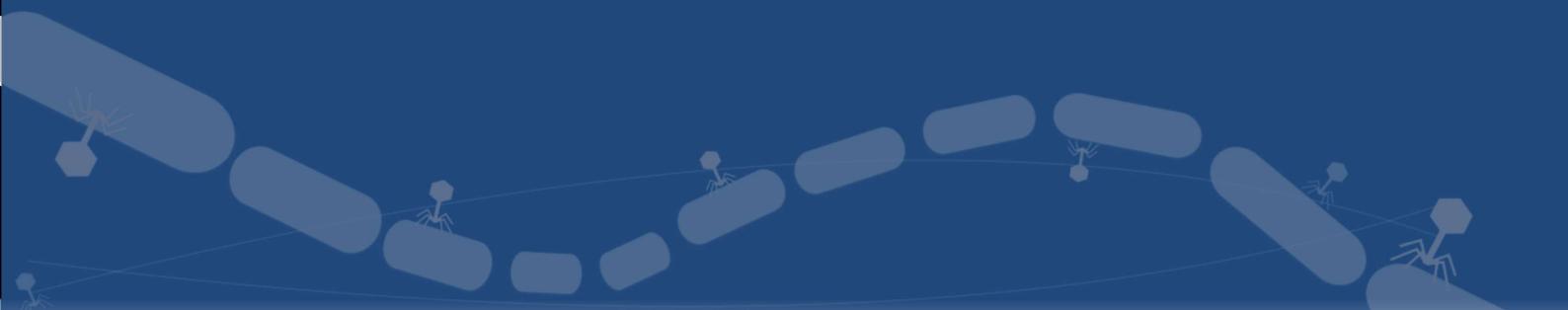


Libro de resúmenes



VIII Reunión Fagoma

2-4 Octubre 2024





VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Comité científico

- Pilar García – Coordinadora (IPLA-CSIC)
- Mª Ángeles Tormo-Más – Organizadora (IIS La Fe)
- Alberto Marina – Organizador (IBV-CSIC)
- Pilar Domingo-Calap – Organizadora (I2SysBio-CSIC-UV)
- Elena G. Biosca – Organizadora (Universitat de Valencia)
- Sonia Porta – Organadora (AINIA)
- Genoveva Arques – Organizadora (AINIA)

Comité técnico

Grupo Pilar García

Lucía Fernández Llamas
Catarina Leal Duarte
Seila Agún García
Andrea Jurado Muñoz
Ana Magdalena Alonso
Aida Martín Llaneza

Grupo Alberto Marina

Francisca Gallego
Javier Mancheño
Sara Zamora
Sonia Belmonte
Damaris Quispe
Adriana Sanz
Elena Cabello

Grupo Elena G. Biosca

José Francisco Català Senent
Isabel Salas Lastres
Belén Álvarez Ortega
Rosa Vázquez García

Grupo AINIA

Sonia Porta
Genoveva Arques

Grupo Pilar Domingo

Tamara Barcos
Carlos Valdivia
Celia Ferriol
Laura Gadea
Miranda Tomás
Lucas Mora
Marco Pardo
Mireia Bernabeu

Grupo Mª Ángeles Tormo

Patricia Bernabé Quispe
Marina Costa Lacuesta
Samara Sabsabi Soriano
Iván Andrés Tarazón



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

COMUNICACIONES ORALES



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque Herramientas Biotecnológicas y patogenicidad

Phage-assisted directed evolution of RNAs and proteins

Alfonso Jaramillo^{1,2*}

De novo Synthetic Biology Lab, i2SysBio, CSIC-University of Valencia, Paterna, Spain.

* Email: Alfonso.Jaramillo@csic.es

In vivo directed evolution techniques enable us to engineer proteins and nucleic acids with targeted functions inside living cells. The efficiency of these techniques depends on the evolution speed and sampling size. In this talk, we demonstrate how engineered full-phages and satellite phages can accelerate the directed evolution process. We have modified the genomes and hosts of phages M13, T7, and P2, creating both full-phage and satellite phage accelerated evolution systems. By developing phage infection cycles that implement positive and negative selections, we enhance activity and specificity, respectively. We will report the use of our accelerated evolution system in continuous cultures to evolve RNA and proteins, showcasing the engineering of the smallest transcription factor activator/repressor, a set of orthogonal transcription factor activators/repressors, and a riboswitch in *E. coli*. Our methodology facilitates the accelerated evolution of any protein, RNA, or their combinations whose activity we can couple to gene expression.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Desarrollo de herramientas basadas en fagos como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos

Gloria Vique Domene

Los fitopatógenos bacterianos causan importantes pérdidas económicas y productivas en la agricultura. El uso de plaguicidas químicos es la solución más común, pero estos productos contaminan el suelo y las aguas subterráneas, además de afectar a otros organismos. Una alternativa ecológica es el biocontrol de fitopatógenos mediante bacteriófagos.

En este estudio, se utilizaron aguas residuales de las depuradoras del Besós y del Prat de Llobregat como fuente para el aislamiento de fagos contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que afecta a cultivos de *Brassica*, y *Erwinia amylovora*, causante del fuego bacteriano en peras y manzanas. Se caracterizaron los fagos genética y morfológicamente, y se evaluó su rango de hospedador y capacidad infectiva, identificando tres con mayor potencial como agentes de biocontrol: ϕ EF1 y ϕ EF2 contra *E. amylovora*, y ϕ XF1 contra *X. campestris* pv. *campestris*.

Los fagos ϕ EF1 y ϕ EF2, combinados en una proporción 1:1, lograron reducir en un 99,7 % las poblaciones de *E. amylovora* sin generar células resistentes, a diferencia de cuando se usaron individualmente. Por su parte, ϕ XF1 eliminó el 99,9 % de *X. campestris* pv. *campestris* en un MOI de 1 tras 5 horas. Los ensayos para prevenir la infección en peras y colinabos demostraron la eficacia de estos fagos, reduciendo significativamente los síntomas del fuego bacteriano y la necrosis por podredumbre negra, respectivamente.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Structural biology of bacteriophage receptor binding proteins and lysins

Mark J. van Raaij¹, Mateo Seoane-Blanco¹, Pablo Soriano-Maldonado^{1,2}

¹Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, calle Darwin 3, 28049 Madrid, Spain

²Faculty of Experimental Sciences, Universidad Francisco de Vitoria (UFV), 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain
mjvanraaij@cnb.csic.es

Contenido del resumen (No puede exceder 300 palabras, incluyendo agradecimientos/ financiación) Arial 11. Interlineado 1.15 puntos)

Bacteriophages specifically recognize and kill host bacteria and they or their bacteriolytic enzymes are emerging as an alternative infection treatments. Detailed knowledge of how bacteriophage receptor binding proteins interact with bacterial membrane components will be of great help to develop new applications. At the end of their infection cycle, bacteriophages produce specific endolysins designed to cleave host peptidoglycan and release their progeny. We study the structures of both types of proteins in complexes with carbohydrate fragments of the cell wall. In this presentation, I'll describe our ongoing work in these projects.

Palabras clave: Fibres, tailspikes, endolysins, structural biology, crystallography

Financiación: Work in the laboratory was funded by grant PID2021-125597NB-I00 financed by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and the European Union Next Generation (EU/PRTR/ERDF).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

APEXp: Harnessing Nature's Potential for Advancing Antimicrobial Discovery and Development

Diana Gutiérrez, Carmen Monreal, Roberto Díez-Martínez
Telum Therapeutics, Plaza Cein 5, Noain, Navarra
cmonreal@telumtx.com

The worrying and increasing development of bacterial resistance has led to the search of alternative substances to antibiotics. One of them is the application of phage lytic enzymes, known as enzybiotics, on which Telum Therapeutics SL is focused. The company is a global drug discovery biotechnology corporation specialized in the use of Engineered Phage Lytic Enzymes (EPLEs) as new antimicrobial products. Telum possess a unique platform (APEXp) that combines metagenomics, bioinformatics, molecular biology, protein engineering and machine learning to search for natural enzybiotics and engineer them to tackle ESKAPE microorganisms. APEXp consist in the search for new enzybiotics in viral and bacterial metagenomes, which is almost an infinite source of new patentable enzybiotics. From this lysins, the modules with enzymatic activity are delineated and combined to create an EPLE through machine learning. The strength of our platform is the capability of generating and screening new proteins in a very fast way, which can be less than 6 months. Moreover, our engineered phage lytic enzymes (EPLEs) enjoy from a highly antimicrobial and antibiofilm activity both *in vitro* and *in vivo*; unlikely resistance development and that can be used for intravenous administration given their stability in mice biodistribution models. To date, 14 proteins have been fully characterized against ESKAPE microorganisms, with a narrow or broad spectrum to tackle just one or different bacteria genera.

Palabras clave: APEXp, metagenomics, protein engineering, machine learning, antimicrobial, phage lytic enzyme

Financiación: Gobierno de Navarra (0011-1365-2022-000281); Ministerio de Ciencia e Innovación (CPP2021-009054, CPP2022-009574, PTQ2021-011910).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Sobre la estabilidad estructural y el mecanismo molecular de la endolisina Pae87 del bacteriófago JG004 de *Pseudomonas aeruginosa*

Jesús M. Sanz, Antonio J. García-Cívico, Pedro García

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040-Madrid

jmsanz@cib.csic.es

La lisozima Pae87, codificada por el bacteriófago JG004 de *Pseudomonas aeruginosa*, posee, cuando se añade exógenamente a suspensiones de este patógeno, una actividad bactericida de carácter fundamentalmente no catalítico según la cual el mayor efecto se conseguiría por el concurso de una subsecuencia peptídica (P87) que desestabiliza la membrana externa de la bacteria, mientras que la actividad enzimática muramidasa sólo jugaría un papel secundario¹. Con objeto de evaluar las perspectivas del uso de Pae87 como enzíbótico, nos propusimos en primer lugar analizar su estabilidad térmica y termodinámica a diferentes pH mediante experimentos de espectroscopía de dicroísmo circular, encontrando que la proteína presenta un máximo de estabilidad a pH 6.0 que coincide con el máximo de su actividad. También se llegó a cabo un análisis *in silico* de la estructura de la proteína, identificando los resíduos que podrían estar implicados en la dependencia de la estabilidad frente al pH y dando pistas para la generación de mutantes termoestables con mayor estabilidad *in vivo*. Por otro lado, para determinar con mayor precisión el papel de la subsecuencia P87, se llevaron a cabo estudios para investigar la posible sinergia entre Pae87 y un permeabilizador inespecífico de membrana como el éster de amina bicíclica EBA31. Los resultados sugieren la existencia de aditividad entre los dos agentes, pero sin indicios de sinergia, lo que confirmaría que P87 posee un mecanismo similar a EBA31 en cuanto a la permeabilización de la membrana externa con carácter inespecífico.

¹ Vázquez y cols. <https://doi.org/10.1107/S2059798322000936>

Palabras clave: Lisozima, permeabilizadores de membrana, ingeniería de proteínas, plegamiento de proteínas, enzíbóticos

Financiación: Proyecto de I+D+i PID2022-139209OB-C21, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y por “FEDER Una manera de hacer Europa”.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bacteriófagos y endolisinás como herramientas biotecnológicas aplicadas a la industria

Genoveva Arqués, Sonia Porta, Amparo de Benito, Ana Torrejón
AINIA, Avenida Benjamín Franklin 7-11, Parque Tecnológico, Paterna, España
garques@ainia.es, sporta@ainia.es

Desde el Centro tecnológico AINIA trabajamos con empresas de diferentes industrias como la cosmética, agroalimentaria, química, etc., innovando en nuevas herramientas biotecnológicas que permitan disponer a las empresas de compuestos biobasados con capacidad antimicrobiana, novedosos, seguros y eficaces, con proyección y que funcionen como solución a los retos microbiológicos presentes en las mismas.

En esta línea, el grupo de Microbiología y Biotecnología Industrial de AINIA ha trabajado en los últimos años en proyectos sobre bacteriófagos y endolisinás. Por un lado, los proyectos se han focalizado en actividades relacionadas con el diagnóstico de contaminaciones microbiológicas, el posterior aislamiento y búsqueda de **bacteriófagos** eficaces frente a los microorganismos problema, su caracterización y estudio de aplicación de los mismos como agentes biocidas. Por otro lado, también se ha trabajado en el desarrollo mediante ingeniería genética de **endolisinás** recombinantes, el estudio de su actividad *in vitro* e *in vivo*, estudios sobre su estabilización y aplicación en producto. En ambos casos, se han realizado bioproducciones a escalas de hasta 20 litros.

Ejemplo de ello son proyectos como: Salud Olivar, donde se diseñaron y produjeron endolisinás recombinantes frente al patógeno *Xylella fastidiosa*; Microbiosafe, donde se realizaron bioproducciones del bacteriófago MS2 y se trabajó en su estabilización mediante spray-drying; Campylophage, donde se aislaron bacteriófagos frente al patógeno *Campylobacter*, con el objetivo de reducir su presencia en aves de corral vivas y procesadas; y Healthytooth, donde se han aislado bacteriófagos frente a microorganismos relacionados con caries y se han diseñado endolisinás recombinantes frente a los mismos.

Palabras clave: Industrias, aplicabilidad de bacteriófagos, endolisinás recombinante, bioproducción

Financiación: Proyectos EUROSTAR e IVACE-FEDER



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Digital coevolution: a computational approach to study bacteria-phage interactions.

Francisco Javier Borrallo Vázquez, Miguel Ángel Fortuna Alcolado.

Estación Biológica de Doñana EBD – CSIC, Sevilla.

fj.borrallo@ebd.csic.es fortuna@ebd.csic.es

Contenido del resumen (No puede exceder 300 palabras, incluyendo agradecimientos/ financiación) Arial 11. Interlineado 1.15 puntos)

El uso terapéutico de fagos para luchar contra infecciones bacterianas no está exento del mismo problema que genera el uso de los antibióticos: la evolución de la resistencia bacteriana. Y al igual que la resistencia a un antibiótico implica el desarrollo de nuevos fármacos, la resistencia a un fago implica la búsqueda de un nuevo fago efectivo contra la nueva variante bacteriana. Este proceso iterativo de resistencia y búsqueda de nuevos fagos puede ser difícil y costoso. Sin embargo, a diferencia de los antibióticos, los fagos pueden contrarrestar por sí mismos la resistencia bacteriana coevolucionando con sus hospedadores. Entender este proceso coevolutivo nos puede ayudar a entrenar y diseñar fagos con alto potencial coevolutivo, capaces de infectar no sólo a la bacteria causante de la enfermedad sino también a sus futuras variantes. Para ello, usamos un gemelo digital desarrollado inicialmente para el estudio del proceso evolutivo y que hemos extendido para estudiar el proceso coevolutivo. En esta plataforma computacional, denominada Avida, programas informáticos autorreplicantes compuestos por un genoma capaz de mutar y generar nuevas variantes coevolucionan de manera análoga a como lo harían los fagos y sus hospedadores bacterianos. En esta presentación introduciré el estudio de la coevolución in silico, mostrando su potencial para generar hipótesis que puedan comprobarse experimentalmente en el laboratorio de microbiología y ayuden a preparar fagos con alto potencial coevolutivo antes de su aplicación terapéutica.

Palabras clave: coevolución, biología computacional, fago, bacteria, artificial-life, sistemas fago-bacteria. (Máximo 6 separadas por comas)

Financiación: This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Knowledge Generation Grant Programme (PID2019-104345GA-I00) and the Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI 2020) of Junta de Andalucía (PY20_00765).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque bacteriófagos en alimentos

Un polisacárido que bloquea la infección de *Lactococcus lactis* por *Ceduovirus*

Claudia Rendueles¹, Javier Nicolas Garay-Novillo²; José Ángel Ruiz-Masó³; Ana Rodríguez¹; Gloria del Solar³; José Luis Barra²; Beatriz Martínez¹

¹ Grupo DairySafe. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC. Paseo Rio Linares s/n. 33300 Villaviciosa, Asturias, España

² Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), CONICET - DQBRC, FCQ, UNC. Córdoba, Argentina

³ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB), CSIC. Madrid, España.

bmf1@ipla.csic.es

La presencia de bacteriófagos que infectan a los cultivos iniciadores en las fermentaciones lácteas supone un problema de gran relevancia, al dar lugar a fermentaciones fallidas o de mala calidad. Es constante, por tanto, la búsqueda de cepas resistentes a fagos.

En experimentos de evolución adaptativa en presencia de la bacteriocina lactococcina 972 se seleccionaron clones de *Lactococcus lactis* resistentes a dicha bacteriocina que, por el contrario, resultaron ser más sensibles a fagos de tipo c2 (*Ceduovirus*) que sus ancestros. Todos ellos comparten la pérdida de un plásmido de 41 kb (p41) que codifica un posible exopolisacárido, aunque la presencia de otras mutaciones adicionales no permitió asociar de forma directa esta pérdida con el fenotipo de sensibilidad a fagos.

En este trabajo estudiamos la infección por el fago c2 del clon *L. lactis* (IPLA1064-WT) y sus derivados (C11 y E11), confirmando una mayor sensibilidad tanto en medio sólido (eficiencia de plaqueo) como en medio líquido (porcentaje de inhibición). Determinamos, además, diferencias significativas en el porcentaje de adsorción, con valores del 40 % en la cepa parental y del 75 % en las derivadas.

Finalmente, empleando el sistema CRISPR-Cas9, eliminamos de forma selectiva el plásmido p41. En este mutante, la eficiencia de plaqueo resulta equiparable a la obtenida en los derivados C11 y E11. Estos resultados confirman la implicación de este polisacárido en el bloqueo de la infección de *L. lactis* por *Ceduovirus*, al bloquear su adsorción, y abren la puerta a futuros trabajos que permitan profundizar en sus propiedades físico-químicas y tecnológicas.

Palabras clave: bacterias lácticas; Infección fágica: resistencia; adsorción; plásmido; edición CRISPR/Cas

Financiación: PID2020-119697RB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033); AYUDAS SEVERO OCHOA (BP20 006); AYUDAS CESAR NOMBELA (CN-SEM-2024-005)



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Fagoterapia en la industria láctea: una solución sostenible contra los biofilms de *Staphylococcus aureus*

Seila Agún, Lucía Fernández, Ana Rodríguez, Pilar García

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n
33300 - Villaviciosa, Asturias, Spain

DairySafe Group. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain.

Seila.agun@ipla.csic.es

La presencia de biofilms de *Staphylococcus aureus* en la industria láctea representa un desafío importante para la seguridad alimentaria, lo que hace imprescindible desarrollar nuevas estrategias de control. En este contexto, el uso de bacteriófagos y sus proteínas surge como una solución innovadora para eliminar biofilms en entornos alimentarios. En este estudio, evaluamos la eficacia de la endolisina LysRODIΔAmi y del bacteriófago philPLA-RODI contra biofilms de *S. aureus* formados en leche, un sustrato relevante en la industria láctea. Nuestros resultados muestran que, aunque los biofilms se forman robustamente tanto en leche como en medio de cultivo, aquellos desarrollados en leche son más resistentes al tratamiento con endolisina, destacando la complejidad de tratar biofilms en matrices alimentarias. Sin embargo, el bacteriófago philPLA-RODI fue más eficaz en la reducción del número de células en los biofilms formados en leche, subrayando el potencial de la fagoterapia como una herramienta eficaz para la seguridad alimentaria. Además, la combinación de philPLA-RODI y LysRODIΔAmi mostró resultados prometedores, especialmente como medida preventiva del desarrollo de biopelículas de *S. aureus* sobre superficies en el sector lácteo. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de adaptar el biocontrol con fagos a los entornos específicos de la industria alimentaria, ofreciendo una alternativa sostenible y efectiva a los antimicrobianos convencionales.

Palabras clave: Bacteriófagos, endolisinas, industria láctea, seguridad alimentaria, biofilms, *Staphylococcus aureus*

Financiación: Este trabajo está financiado por el proyecto PID2022-140988OB-I00 del MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE y por la beca FPI PRE2020-093719 (Ministerio de Ciencia e Innovación, España).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

CRISPR-Cas9 engineering of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* to deliver the endolysin Ply511 against *L. monocytogenes*, a proof of concept.

David Sáez Moreno¹

1. Univesidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal
2. LABBELS associate laboratory, Braga / Guimaraes, Portugal ¹

e-mail: david_gamonal95@hotmail.com

Other authors:, João Paulo Carvalho ¹, Joana Cunha ^{1,2}, Luís Daniel Rodrigues de Melo ^{1,2}, Lucília Domingues ^{1,2}, Joana Azeredo ^{1,2}

1. Univesidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal
2. LABBELS associate laboratory, Braga / Guimaraes, Portugal

In this study, we investigate the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii* to deliver the endolysin Ply511 against *Listeria monocytogenes* as a proof of concept, towards an engineered probiotic. *L. monocytogenes* is a Gram-positive pathogen causative of human infections, resulting in febrile gastroenteritis, perinatal infection, and central nervous system infections. These infections are frequently acquired through the ingestion of contaminated food. Endolysins, bacteriophage-derived enzymes, have emerged as promising antimicrobial agents due to their ability to specifically target and degrade bacterial cell walls.

We employed CRISPR-Cas9 to genetically modify both yeasts to display or secrete the endolysin Ply511, integrating in different chromosomes. The expression of the genetic construction and the enzymatic activity of the engineered yeast against heat-killed cells were confirmed. In killing assays, the modified *S. cerevisiae* achieved a reduction in *L. monocytogenes*, with the yeast secreting Ply511 showing a superior activity than the display. The spent supernatants containing the endolysin were also recovered and could reduce *L. monocytogenes*, which represents the first time this endolysin shows activity in spent supernatant.

We demonstrate the potential of genetically engineered *S. cerevisiae* and *S. boulardii* to secrete endolysins as a promising approach for targeting gut pathogens. Future efforts will focus on utilizing *Saccharomyces boulardii* as a probiotic delivery system to ensure efficient *in vivo* delivery of endolysins to the gut, thus advancing towards a viable engineered probiotic solution for preventing bacterial infections.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Nuevos Fagos de *Listeria* como Herramienta de Seguridad Alimentaria

Amaia Lasagabaster, Elisa Jiménez, María Lavilla, Ainara García, Cristina García y Miguel Romeo.

AZTI, Food Research, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea, Edificio 609, 48160 Derio – Bizkaia.

alasa@azti.es

El control de *L. monocytogenes* supone un gran reto para la industria alimentaria y la salud pública, puesto que es responsable de la listeriosis, una grave enfermedad zoonótica transmitida por alimentos contaminados a través de materias primas o por contaminación cruzada durante su procesado. Es una bacteria muy resistente, capaz de sobrevivir en condiciones adversas de temperatura, acidez y salinidad. Su capacidad de formar biopelículas dificulta su eliminación en instalaciones de procesado, aumentando el riesgo de contaminación. Resulta particularmente crítica su presencia en alimentos listos para el consumo, que se consumen sin cocinado o tratamiento térmico previo. El empleo de bacteriófagos específicos muestra gran potencial para su biocontrol, existiendo actualmente dos productos comerciales: PhageGuard Listex™ y Listshield™.

En este estudio se trabajó con seis nuevos fagos contra *Listeria*. Los fagos se clasificaron dentro de la familia *Myoviridae* y género P100-like, mostrando diferencias genéticas entre sí y con otros listeriafagos conocidos. Todos eran estrictamente virulentos sin genes asociados a producción de toxinas, virulencia bacteriana o resistencia a antibióticos. Además, mostraron gran estabilidad bajo diversas condiciones de pH y temperatura, y un amplio espectro lítico, infectando entre el 84% y 93% de cepas ensayadas, incluyendo *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* y diferentes serotipos de *L.monocytogenes*. La combinación de varios fagos en un cóctel aumentó la susceptibilidad bacteriana a la infección. Los ensayos de eficacia en salmón crudo y ahumado mostraron que la aplicación del cóctel reduce significativamente la carga de *L. monocytogenes*, sugiriendo su potencial como herramienta específica y natural para el biocontrol de este patógeno en la industria alimentaria.

Palabras clave: *Listeria*, listeriosis, listeriafago, biocontrol, seguridad alimentaria.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos SEAFOODTOMORROW (H2020, 773400), FAGOSASUN (Programa Transferencia Tecnológica 2023 de la Diputación Foral de Bizkaia, 6/12/TT/2023/00004) y BIOTEGANIA (PLEC2023-010275 financiado por MCIU/AEI/10.13039/50110 0011033, TransMisiones 2023).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque Fagoterapia y Biocontrol

Long-Term Coastal Analysis Indicates Time-Shift in Viral Abundance Linked to Climate Change

Lopez-Alforja X., Sà E., Cardelús C., Balagué V., Forn I., Pernice M.C., Gasol J.M., Coutinho F.H., Massana R. & Vaqué D.

Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Barcelona
xabierlopez@icm.csic.es

Viruses play a fundamental role in controlling the abundance and composition of microbial communities, as well as in the biogeochemical cycles and productivity of marine ecosystems. Although the spatial distribution of viruses has been investigated, little is known about the temporal variations in viral communities. Furthermore, climate change and its effects on the environment can have consequences for the temporal dynamics of viruses and their potential hosts. To address this, we analyzed two decades of surface samples from the Blanes Bay Microbial Observatory (BBMO, Catalan Coast) to assess viral abundance and environmental changes. Our time series analysis revealed rising temperature and water transparency, alongside declining phosphate and nitrite levels, chlorophyll concentration, and microbiota, including viruses and bacterial hosts—indicating a shift toward increased oligotrophy. Notably, the last decade showed a marked decline in viral abundance, driven by these environmental changes. While most studies rely on simple correlations, the non-linear nature of virus-host interactions, makes traditional methods insufficient to capture the full complexity of the system. Time-varying factors further complicate these relationships, underlining the need for integrating sophisticated approaches to better understand viral dynamics and their role in future climate models. General Additive Models, anomaly analysis, and artificial neural networks (ANNs) proved effective for disentangling these dynamics and improving the understanding of viral responses to climate shifts. These insights are crucial for incorporating viral components into future ocean and climate models, enhancing predictions.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Aislamiento y Caracterización de Bacteriófagos Líticos para el Tratamiento de Infecciones por *Staphylococcus spp*

Samara Sabsabi¹, Patricia Bernabé-Quispe¹, Marina Costa¹, Irene Cruz¹, M^a del Pilar Marín², Rosa Ana Espada, Amparo Valentín^{1,3}, Juan Frasquet^{1,3}, Pablo Taberner-Pérez^{1,3} y M^a Ángeles Tormo-Mas^{1,3}

¹Grupo de Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLaFe).

²Unidad de Microscopía IISLaFe. ³Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

samara_sabsabi@iislafe.es

Staphylococcus spp son un grupo de bacterias de gran relevancia clínica que causan una amplia variedad de infecciones, desde leves infecciones de la piel a más severas como sepsis. Actualmente, su capacidad de formar biofilm y de adquisición de genes asociados a la resistencia a los antibióticos, hacen de estas bacterias un riesgo para la salud y precisan del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de infecciones.

La terapia fágica representa un enfoque innovador en el tratamiento de infecciones bacterianas, aprovechando la capacidad natural de los bacteriófagos para infectar y destruir bacterias diana sin afectar a la microbiota normal.

En este trabajo, se caracterizaron fagos líticos, aislados a partir de aguas residuales y ambientales, para el tratamiento de infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus lugdunensis* multirresistentes a antibióticos.

Para la caracterización de cada fago, se realizó una evaluación de su rango de hospedador frente a una serie de cepas clínicas de cada especie, se estudió la cinética de infección y su estabilidad frente al pH y temperatura. Asimismo, se observó su morfología mediante microscopía electrónica y se secuenció su genoma, a partir de los cuales se realizó un análisis *in silico* para asegurar la ausencia de genes de virulencia, de toxinas o genes relacionados con la lisogenia. De los fagos obtenidos, se seleccionaron aquellos que presentaban las características óptimas para su posible uso en fagoterapia y se evaluó su capacidad de eliminar el biofilm.

El uso de bacteriófagos se considera una de las vías más prometedoras como tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes, disponer de una amplia fagoteca facilitará el futuro tratamiento de los pacientes.

Palabras clave: *Staphylococcus spp*, infecciones, biofilm, bacteriófagos, fagoterapia.

Financiación: Proyecto PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto AICO/2021/306 financiado por la Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital de la Generalitat Valenciana.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Caracterización biológica y morfológica de bacteriófagos activos frente a la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*.

Isabel Salas¹, Rosa Vázquez¹, Ana Palacio-Bielsa², Belén Álvarez^{1,3}, Sergi Maicas¹ y Elena G. Biosca¹

1 Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia.

2 Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza.

3 Área de Investigación Aplicada y Extensión Agraria, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, Madrid.

elena.biosca@uv.es

La bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria* es uno de los agentes etiológicos de la mancha bacteriana en los cultivos de tomate y pimiento en todo el mundo, lo que provoca importantes pérdidas. Los métodos de control convencionales que utilizan derivados del cobre a menudo son ineficaces debido a la aparición de resistencias y tienen repercusiones negativas para el medio ambiente y la salud. Como alternativa, se está considerando el uso de los virus bacteriófagos (fagos) como opciones de control sostenibles y específicas. En este trabajo, se ha iniciado la caracterización biológica de una colección de fagos de *X. vesicatoria* mediante ensayos de rango de hospedadores y especificidad, así como con experimentos de biocontrol *in vitro* e *in vivo* con el objetivo de obtener candidatos a agentes de control biológico de este patógeno en condiciones españolas. Los fagos analizados mostraron actividad lítica solo frente a cepas españolas de *X. vesicatoria*, lo que mostró su especificidad y permitió seleccionar tres de ellos para su posterior caracterización. Los ensayos de biocontrol *in vitro* evidenciaron la capacidad de los fagos para reducir el crecimiento de las cepas españolas cuando se aplicaron solos o combinados en un cóctel. Además, cuando la capacidad de biocontrol se evaluó en material vegetal, tanto *ex vivo* como en planta, el cóctel de fagos redujo significativamente los síntomas de la mancha bacteriana. La caracterización morfológica de los fagos seleccionados mediante microscopía electrónica de transmisión reveló que podrían pertenecer a la anterior familia *Myoviridae*. Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de estos fagos como agentes de control biológico de *X. vesicatoria* en los cultivos españoles.

Palabras clave: Mancha bacteriana, bacteria fitopatógena, tomate, fago, actividad lítica, biocontrol.

Financiación: El presente trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2021-123600OR-C44, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER Una manera de hacer Europa, FEDER/UE.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Fagos como herramientas biomédicas frente a *Klebsiella pneumoniae*

Laura Gadea-Pallás, Celia Ferriol-González, Lucas Mora-Quilis, Tamara Barcos-Rodríguez, Pilar Domingo-Calap
Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Universitat de València-CSIC,
Paterna 46980, España
pilar.domingo@uv.es

Klebsiella pneumoniae es una bacteria capsular con una amplia diversidad, siendo el tipo capsular un factor determinante para la infección por fagos. Esta especificidad limita el desarrollo de tratamientos de amplio espectro basados en fagos, sugiriendo la necesidad de tratamientos personalizados para cada paciente. En este trabajo se presentan diferentes estrategias basadas en fagos para su implementación como herramientas biomédicas frente a *K. pneumoniae*. Estas aproximaciones incluyen el aislamiento de fagos en cepas de referencia y en aislados clínicos, así como la implementación de cócteles de fagos para ampliar el rango de infección y/o para retrasar la emergencia de bacterias resistentes. Además, se han realizado estudios de sinergias entre fagos y de fagos con antibióticos, estableciendo interacciones que demuestran una mayor eficacia de los tratamientos combinados. Estos resultados sugieren el potencial preventivo y terapéutico de los fagos de *Klebsiella* en la lucha contra las bacterias multirresistentes.

Palabras clave: Fagoterapia, cóctel de fagos, sinergia, resistencia, antibióticos, cápsula.

Financiación:

- “Bacteriófagos como herramienta biomédica contra *Klebsiella sp*”. Subvenciones a la excelencia científica de juniors investigadores (SEJIGENT), GVA. PI: P. Domingo-Calap
- “Hacia una terapia con fagos contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenems”. Agencia Estatal de Investigación, Plan Nacional Proyectos I+D+i, Retos-Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación. PI: P. Domingo-Calap



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Once Upon a Time: The Tale of One Abundant Marine Virus and Another Active One

Maria Alvarez Sanchez^{1,2}, Francisco Martinez-Hernandez^{1,2}, Marina Vila Nistal^{1,2}, Javier Lopez-Simón^{1,2}, Monica Lluesma-Gomez^{1,2}, Josefa Antón Botella^{1,2}, and **Manuel Martinez-Garcia^{1,2}**

¹ Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante

² Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio Ramón Margalef (IMEM), Universidad de Alicante

Summary

The discovery and identification of abundant and active viruses that account for a large pool of carbon and nutrients and play a major role in the viral shunt are paramount to building accurate ecological models. In this talk, guided by the combination of multiomic techniques based on single-virus genomics, bioorthogonal non-canonical amino acid tagging, metagenomics, and microfluidics, I will show the biological and ecological features and potential impact of two contrasting marine uncultured viral models: the virus vSAG 37-F6 and Rhodothermus-like viruses. The former is likely the most abundant and ubiquitous virus in the oceans, while the latter, recently discovered by novel technologies, probably have the highest turnover and activity in coastal environments. Overall, these two viruses, with marked differences in lifestyles, have an important impact on marine biogeochemical cycles.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Arbitrium communication shows a complex and novel phage-host interaction to coordinate lysis- lysogeny decision

Sara Zamora-Caballero 1, Cora Chmielowska 2, Francisca Gallego 1, Javier Mancheño 1, Nuria Quiles-Puchalt 3, José Penadés 2, Alberto Marina 1
1.- Instituto de biomedicina de Valencia
2.- Centre for Bacterial Resistance Biology, Imperial College London, London, UK.
3.- Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, Universidad CEU Cardenal Herrera, CEU Universities, Alfara del Patriarca, Spain
szamora@ibv.csic.es
Contenido del resumen (No puede exceder 300 palabras, incluyendo agradecimientos/ financiación) Arial 11. Interlineado 1.15 puntos)

Arbitrium is a quorum sensing mechanism used by bacteriophages and other mobile genetic elements within the *Bacillota* phylum to communicate via peptides. In the SPbeta family phages, where arbitrium was first discovered, this system plays a crucial role in deciding between lysis and lysogeny. This communication system has led to the evolution of a unique repression mechanism, setting SPbeta phages apart from the typical mechanism seen in lambda phages. Our structural and functional research reveals that this novel repression mechanism involves a six-gene operon, which we have named the "SPbeta phages repressor operon" (sro). Notably, our structural analysis shows that one of the master repressors exhibits a recombinase-like folding, distinct from the classic cl-cro phage repressors. The first three proteins of the sro operon, are essential for relaying the signals from the arbitrium system to the repression activities. During this process, the sro transducer proteins also interact with host systems, involving the bacteria in the decision-making process between lytic and lysogenic cycles. The presentation will explain the complex repression system used by SPbeta phages, which is vital for making life cycle decisions based on the density of both phage and host populations. We would like to thank the ERC synergy grant and the plan nacional from the Spanish government for the funding.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Caracterización *in vitro* del bacteriófago vB_AvS-B1 y biocontrol de *Aeromonas veronii* en *Mytilus galloprovincialis*

Roberto M. Guerra¹, Yuliia Faidiuk², Maria José Figueras¹, Dolors Furones³, Krystyna Dabrowska², Isabel Pujol-Bajador^{1,4}, Ana Fernández-Bravo¹

¹Unidad de Microbiología, Departamento Ciencias Médicas Básicas, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, España.

²Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Weigla 12, 53-114, Wrocław, Polonia.

³Programa de Acuicultura, Institut de Recerca y Tecnología Agroalimentàries (IRTA), Ctra. Poblenou. Km 5,5, 43540, La Ràpita, España.

⁴Laboratorio de Microbiología, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Salut Sant Joan de Reus-Baix Camp, 43204 Reus, España.

juanroberto.monllor@urv.cat

El género bacteriano *Aeromonas* comprende varias especies consideradas patógenos oportunistas emergentes para el ser humano, produciendo enfermedades como gastroenteritis, infecciones de tejidos blandos y bacteriemia. Además, *Aeromonas* es un patógeno de varias especies acuáticas, causando anualmente enormes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura. Particularmente, la especie *Aeromonas veronii* es una de las especies del género más prevalentes en casos clínicos, además de haber sido relacionada con diferentes brotes infecciosos en acuicultura. El uso de bacteriófagos en clínica y como herramienta de biocontrol son campos de investigación de gran interés actualmente. En este sentido, el número de bacteriófagos específicos de *Aeromonas veronii* representa una proporción pequeña de entre los bacteriófagos de *Aeromonas* caracterizados. Los objetivos de este estudio fueron realizar una caracterización *in vitro* del bacteriófago vB_AvS-B1, aislado de la estación depuradora de aguas residuales de Reus junto con su cepa hospedadora *Aeromonas veronii* B1, y testar el potencial de este bacteriófago como herramienta de biocontrol en un modelo *in vivo* de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) previamente infectado con la cepa B1. Los resultados *in vitro* revelaron que vB_AvS-B1 posee una morfología tipo siphovirus, un rango de hospedador altamente específico para la cepa B1, y una estabilidad considerable en diferentes condiciones de temperatura y pH. Además, este bacteriófago mostró actividad lítica frente a su cepa en cultivo líquido y capacidad de prevenir la formación de biofilm. Por último, los resultados *in vivo* demostraron que vB_AvS-B1 es capaz de propagarse en mejillones cuando se produce una coinfección con la cepa B1, sin observarse diferencias significativas en la carga bacteriana con respecto a los animales infectados no tratados con el bacteriófago.

Palabras clave: *Aeromonas veronii*, bacteriófago, acuicultura, *in vitro*, *in vivo*, *Mytilus galloprovincialis*.

Agradecimientos: La URV y la Diputación de Tarragona han financiado la beca predoctoral PIPF, 2020PMF-PIPF-13 de Roberto Monllor Guerra.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Diferentes mecanismos de inmunidad frente bacteriófagos en *Marinomonas mediterranea* dependen del sistema PpoR/PpoS

Christian Martínez-Jiménez, Andrea Martínez-Cazorla, Víctor Andrés-González, Patricia Elío-Lucas, Antonio Sánchez-Amat

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia

christianjose.martinezj@um.es

Marinomonas mediterranea es una bacteria marina melanogénica aislada en el Mediterráneo (1). La primera cepa descrita, MMB-1, es resistente a bacteriófagos de la familia *Autographiviridae* gracias a la actuación coordinada de dos sistemas CRISPR-Cas, I-F y III-B (2), cuya expresión está regulada por un sistema de dos componentes formado por una histidín kinasa sensora de membrana (PpoS) y un regulador de respuesta (PpoR) (3). La cepa MMB-3 es resistente a varios de los bacteriófagos aislados, aunque sus dos sistemas CRISPR-Cas (2) no presentan espaciadores frente a ellos. Además, se han delecionado ambos sistemas CRISPR-Cas y la cepa MMB-3 sigue siendo resistente frente a estos fagos, lo que sugiere la actuación de uno o más sistemas de defensa alternativos.

Para identificar genes implicados en los mecanismos de defensa frente a fagos, se ha desarrollado un protocolo de mutagénesis al azar usando transposones con el que se ha conseguido aislar el mutante MMB-3 S1. La caracterización de este mutante ha revelado que el transponón ha interrumpido el gen que codifica el regulador de respuesta PpoR. De forma similar al mutante homólogo equivalente (*ppoR*⁺) de MMB-1, este mutante se caracteriza por, además de ser sensible a los bacteriófagos, presentar una menor actividad de diferentes enzimas oxidativas como la tirosinasa, responsable de la producción de melaninas (3). Estos resultados demuestran que diferentes cepas de *Marinomonas mediterranea* comparten un sistema de dos componentes común implicado en la regulación de diferentes sistemas de defensa frente a fagos. La identificación y caracterización de los sistemas de defensa implicados en la resistencia de MMB-3 frente a fagos están en la actualidad bajo estudio.

Bibliografía:

- [1] Solano, F. et al. Appl Environ Microbiol. 1997; 63(9):3499-506.
- [2] Silas, S et al. eLife. 2017; 6:e27601.
- [3] Lucas-Elío, P. et al. Sci Rep. 2021;11(1):20564.

Palabras clave: Sistemas de defensa, CRISPR-Cas, Sistema de dos componentes, Mutagénesis con transposones, Bacteriófagos

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2021-124464NB-I00 MCIN/AEI y “FEDER, Una manera de hacer Europa” y por las ayudas predoctorales del Plan Propio de la Universidad de Murcia a C. M.-J., A. M.-C. y V. A.-G.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Environmental phage cocktail frente a Pseudomonas como fuente de novedad taxonómica y enzimática

Aitana Escolano-Vico¹, Valentín Gangloff¹, Pedro Blanco-Picazo², Maite Muniesa², Josefa Antón¹, Fernando Santos¹

¹Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, España

²Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

aitana.escolano@ua.es

Los bacteriófagos son grandes moduladores de las poblaciones microbianas en los ecosistemas naturales, influyendo en el número, diversidad y evolución de las mismas. Bajo la hipótesis de que los virus se mueven entre biomas cambiando de hospedador, se ha seleccionado el género *Pseudomonas* como hospedador de estudio, por su ubiquidad en ambientes naturales y el interés de especie patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, una de las principales bacterias multirresistentes a antibióticos y causante de infecciones nosocomiales. Mediante culturómica de alto rendimiento, basada en enriquecimientos, se han obtenido 71 fagos que infectan a una colección de 45 aislados de *Pseudomonas* obtenidos a partir de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Además, se ha conformado un "environmental phage cocktail" (ePC), resultado de la suma de las fracciones víricas de los enriquecimientos, el cual ha sido secuenciado. Análisis de rango de hospedador han determinado que el ePC es capaz de lisar al 100% de los aislados de *P. aeruginosa*. En paralelo, se ha construido una red de interacciones fago-hospedador y se ha determinado que el *Minimum Cocktail Size* (MCS) para la lisis de más del 90% de aislados de *Pseudomonas* estaría formado por 4 de los fagos aislados. Sin embargo, se ha comprobado que el porcentaje de lisis con el MCS no es superior al 65%. Los análisis bioinformáticos preliminares llevados a cabo con el viroma del ePC parecen indicar que este constituiría una nueva fuente de novedad taxonómica y enzimática frente a *P. aeruginosa* (por ejemplo, codificando nuevas endolisinas con potencial biotecnológico). La secuenciación y análisis de los fagos aislados permitirá profundizar en este estudio, así como estudiar la cultivabilidad de los fagos propagados en los enriquecimientos.

Palabras clave: *Pseudomonas*, "phage cocktail", aguas residuales, interacción virus-hospedador, culturómica

Financiación: CIPROM/2021/006 "New strategies to study virus-host interactions from humans to the ecosystem: a "One-Health" perspective (VIRHOS)"



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

PÓSTERS



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 1: Patogenicidad

Las Islas de Patogenicidad de *Staphylococcus aureus* regulan genes de virulencia mediante antiterminación procesiva.

Marina Costa¹, Mercedes Cervera-Alamar^{1,2}, Patricia Bernabé-Quispe¹, Samara Sabsabi¹, Irene Cruz¹, Guillermo García-Laínez¹, María Ángeles Tormo-Mas^{1,3}.

¹Grupo de Investigación en Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, ²Universidad Católica de Valencia, ³Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

marina_costa@iislafe.es

Las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) son elementos genéticos móviles que codifican con frecuencia factores de virulencia (resistencia a antibióticos, toxinas...) que pueden ser diseminados a otras poblaciones bacterianas a través de bacteriófagos. En este estudio se ha demostrado que son importantes en la regulación de genes cromosómicos del huésped.

Mediante ensayos transcripcionales por *tiling array*, RNA-seq y RT-qPCR en cepas de *S. aureus* con SaPIs inducidas se detectó entre otros un aumento de expresión en el operón *crtOPQMN* y en *GNAT*, genes responsables de la síntesis de estafilocantina o STX (carotenoide con actividad antioxidante) o bien relacionados con resistencia a aminoglicósidos, respectivamente. Las proteínas PtIA-M codificadas en SaPIs se identificaron como responsables de la sobreexpresión de estos genes, observándose una co-transcripción en esa zona comenzando en *isaA* hasta *copA*. Mediante la generación de diversos mutantes se pudo establecer que PtIA-M ejerce una regulación por antiterminación procesiva desde *isaA* que resulta en un incremento de STX.

Para comprobar la relación entre virulencia y PtIA-M se realizó un ensayo de supervivencia en macrófagos resultando en un incremento de resistencia a fagocitosis y supervivencia de las bacterias fagocitadas cuando dichas proteínas eran sobreexpresadas. De esta forma se demuestra que las proteínas de las SaPIs son multifuncionales ya que, además de su función dentro de la isla, son capaces de afectar a la regulación de genes cromosómicos incluso modulando genes de virulencia a través de un mecanismo de antiterminación procesiva.

Palabras clave: Islas de Patogenicidad, *Staphylococcus aureus*, estafilocantina, antiterminación procesiva, virulencia.

Financiación: Proyectos SAF2017-82251-R y PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 2. Bacteriófagos en sistemas naturales

Sistemas CRISPR-Cas y Resistencia a Bacteriófagos en Nuevas Cepas Amelanogénicas de *Marinomonas mediterranea*

Víctor Andrés-González, Francisca Fernández-Martínez, Jonatan C. Campillo-Brocal, Antonio Sánchez-Amat

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia

victor.andresg@um.es

Marinomonas mediterranea es una bacteria melanogénica aislada de la microbiota de *Posidonia oceanica* (1). Se caracteriza por la producción de diversas enzimas con actividad oxidasa y antimicrobiana (2), así como a la expresión de sistemas CRISPR-Cas de tipo I-F y III-B que colaboran en la defensa frente a bacteriófagos (3).

A partir de la microbiota de *Cymodocea nodosa*, ha sido posible aislar por primera vez dos cepas amelanogénicas de *M. mediterranea* [NMB-1 (DL1) y NMB-2 (DL4)]. Los análisis filogenéticos de estas cepas han confirmado la ausencia del gen *ppoB1*, que codifica la tirosinasa implicada en la producción de melaninas (4), lo que justifica la ausencia de pigmentación. *M. mediterranea*, NMB-1 y NMB-2 presentan sistemas CRISPR-Cas en su genoma. NMB-1 posee un sistema de tipo I-F con una organización similar al presente en el resto de miembros de la especie, y otro de tipo III-U, con la proteína Cas1 fusionada a una retrotranscriptasa. NMB-2, solo tiene un sistema de tipo I-F que se encuentra interrumpido por una transposasa. Curiosamente, ambas cepas son resistentes a todos los bacteriófagos aislados por el grupo de investigación capaces de infectar a otras cepas de *M. mediterranea*, aún sin contar con espaciadores frente a ellos. Resultados preliminares indican que la resistencia en estas cepas es debida a la falta de receptores.

Referencias:

1. Espinosa, E. et al., Int J Syst Evol Microbiol. 2010 60(1):93–8.
2. Campillo-Brocal J.C. et al., BMC Genomics. 2015 24;16(1).
3. Silas, S. et al., eLife 2017 17;6:e27601.
4. Lopez-Serrano et al. Gene. 2004 Nov 10;342(1):179–87.

Palabras clave: *Marinomonas mediterranea*, CRISPR-Cas, bacteriófagos, melanogénesis

Agradecimientos: Los autores agradecen a Diana Morales Blázquez y Laura Lozano Ruiz su colaboración en el aislamiento de las cepas NMB-1 y NMB-2.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2021-124464NB-I00 MCIN/AEI y “FEDER, Una manera de hacer Europa” y a la ayuda predoctoral del Plan Propio de la Universidad de Murcia a V. A.-G.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bacteriófagos líticos aislados del medio ambiente para el biocontrol de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Belén Álvarez^{1,2}, Félix Morán¹, Nerea García¹, Rosa Vázquez¹, Isabel Salas¹, José F. Català-Senent¹, Ana Palacio-Bielsa³, Sergi Maicas¹, Elena G. Biosca¹

¹ Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia

² Área de Investigación Aplicada y Extensión Agraria, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, Madrid

³ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Zaragoza
elena.biosca@uv.es

El control biológico de las enfermedades de plantas causadas por patógenos bacterianos puede considerarse una alternativa ecológicamente sostenible al control químico. La creciente limitación de la Unión Europea a los productos agroquímicos también favorece el interés por nuevos agentes de control bioseguros. Un método biológico puede ser el uso de virus bacteriófagos (fagos) con actividad lítica específica y efectiva frente al patógeno de interés. En este trabajo se ha evaluado el potencial de biocontrol de fagos líticos frente a la especie fitopatógena *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap), causante de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro, que amenaza seriamente la producción de estos cultivos y cuyo control se ve dificultado por la falta de productos eficaces.

Se han aislado fagos a partir de muestras medioambientales, que presentan actividad lítica frente a cepas españolas de Xap y que, por tanto, pueden ser efectivos en planta, en estas condiciones. Se ha iniciado su caracterización, determinando su rango de huéspedes, especificidad y capacidad para controlar el patógeno en ensayos *in vitro*. Los resultados han permitido la selección de fagos específicos que infectan y lisan distintas cepas españolas de Xap, reduciendo de manera significativa las poblaciones del patógeno *in vitro*. Con estos fagos seleccionados se ha iniciado su caracterización morfológica por microscopía electrónica y la secuenciación de su genoma, así como la evaluación de su capacidad para el control biológico en material vegetal. Los resultados son prometedores, indicando que estos fagos líticos podrían convertirse en nuevos agentes de biocontrol que podrían incluirse en los programas de gestión integrada de plantas leñosas para controlar la mancha bacteriana.

Financiación: El presente trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2021-123600OR-C44, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por FEDER Una manera de hacer Europa, FEDER/UE.

Palabras clave: mancha bacteriana, bacteria fitopatógena, prevención, fago, actividad lítica.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Pheromone promiscuity of phage Phi3T can be modulated by specific mutations

Belmonte-Ballester Sonia, Zamora-Caballero Sara, Felipe-Ruiz Alonso, Marina Alberto

Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), CSIC and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Valencia, Spain
sbelmonte@ibv.csic.es

In Firmicutes, quorum sensing (QS) communication is primarily controlled by the RRNPPA family through pheromone-receptor signaling. This process involves the production and release of an inactive propeptide, which is subsequently processed by external proteases into an active pheromone (Phr) that is re-imported into the cell. The Rap proteins, a specific RRNPPA subfamily found in *Bacillus* species, play a crucial role in regulating sporulation and competence. Pheromones are typically encoded within the propeptide sequence of the Rap receptor, exhibiting highly specific binding interactions. These sequences may contain multiple copies of the same or related pheromones with slight variations, similar to other signaling systems. Our previous research revealed that in phage Phi3T, different pheromones within the same propeptide can bind to their receptors with varying affinities and kinetics, suggesting that this diversity may serve distinct biological functions in the bacterial community. In this study, we further explore this hypothesis by modulating the stability and affinity of Rap-Phr interactions through specific mutations, using cognate peptides from phage Phi3T and related systems. Through various biophysical techniques, we analyzed these interactions and characterized the structural mechanisms underlying pheromone recognition. Our aim is to elucidate the functional and biological significance of the 'partial selectivity' observed in Rap-Phr interactions of phage Phi3T, offering deeper insights into QS dynamics in bacterial communities.

Palabras clave: Rap, Phi3T, promiscuity, *Bacillus*, pheromone

Financiación: Predoctoral contract (PREP2022-000550) awarded by Ministerio de Ciencia e Innovación

‘Talking phages’ Project awarded by ERC Grant



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Environmental phage cocktail frente a Pseudomonas como fuente de novedad taxonómica y enzimática

Aitana Escolano-Vico¹, Valentín Gangloff¹, Pedro Blanco-Picazo², Maite Muniesa², Josefa Antón¹, Fernando Santos¹

¹Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, España

²Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

aitana.escolano@ua.es

Los bacteriófagos son grandes moduladores de las poblaciones microbianas en los ecosistemas naturales, influyendo en el número, diversidad y evolución de las mismas. Bajo la hipótesis de que los virus se mueven entre biomas cambiando de hospedador, se ha seleccionado el género *Pseudomonas* como hospedador de estudio, por su ubiquidad en ambientes naturales y el interés de especie patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, una de las principales bacterias multirresistentes a antibióticos y causante de infecciones nosocomiales. Mediante culturómica de alto rendimiento, basada en enriquecimientos, se han obtenido 71 fagos que infectan a una colección de 45 aislados de *Pseudomonas* obtenidos a partir de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). Además, se ha conformado un “environmental phage cocktail” (ePC), resultado de la suma de las fracciones víricas de los enriquecimientos, el cual ha sido secuenciado. Análisis de rango de hospedador han determinado que el ePC es capaz de lisar al 100% de los aislados de *P. aeruginosa*. En paralelo, se ha construido una red de interacciones fago-hospedador y se ha determinado que el *Minimum Cocktail Size* (MCS) para la lisis de más del 90% de aislados de *Pseudomonas* estaría formado por 4 de los fagos aislados. Sin embargo, se ha comprobado que el porcentaje de lisis con el MCS no es superior al 65%. Los análisis bioinformáticos preliminares llevados a cabo con el viroma del ePC parecen indicar que este constituiría una nueva fuente de novedad taxonómica y enzimática frente a *P. aeruginosa* (por ejemplo, codificando nuevas endolisinas con potencial biotecnológico). La secuenciación y análisis de los fagos aislados permitirá profundizar en este estudio, así como estudiar la cultivabilidad de los fagos propagados en los enriquecimientos.

Palabras clave: *Pseudomonas*, “phage cocktail”, aguas residuales, interacción virus-hospedador, culturómica

Financiación: CIPROM/2021/006 “New strategies to study virus-host interactions from humans to the ecosystem: a “One-Health” perspective (VIRHOS)”



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Long-Term Coastal Analysis Indicates Time-Shift in Viral Abundance Linked to Climate Change

Lopez-Alforja X., Sà E., Cardelús C., Balagué V., Forn I., Pernice M.C., Gasol J.M., Coutinho F.H., Massana R. & Vaqué D.

Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Barcelona
xabierlopez@icm.csic.es

Viruses play a fundamental role in controlling the abundance and composition of microbial communities, as well as in the biogeochemical cycles and productivity of marine ecosystems. Although the spatial distribution of viruses has been investigated, little is known about the temporal variations in viral communities. Furthermore, climate change and its effects on the environment can have consequences for the temporal dynamics of viruses and their potential hosts. To address this, we analyzed two decades of surface samples from the Blanes Bay Microbial Observatory (BBMO, Catalan Coast) to assess viral abundance and environmental changes. Our time series analysis revealed rising temperature and water transparency, alongside declining phosphate and nitrite levels, chlorophyll concentration, and microbiota, including viruses and bacterial hosts—indicating a shift toward increased oligotrophy. Notably, the last decade showed a marked decline in viral abundance, driven by these environmental changes. While most studies rely on simple correlations, the non-linear nature of virus-host interactions, makes traditional methods insufficient to capture the full complexity of the system. Time-varying factors further complicate these relationships, underlining the need for integrating sophisticated approaches to better understand viral dynamics and their role in future climate models. General Additive Models, anomaly analysis, and artificial neural networks (ANNs) proved effective for disentangling these dynamics and improving the understanding of viral responses to climate shifts. These insights are crucial for incorporating viral components into future ocean and climate models, enhancing predictions.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE philPLA-LAVI, UN FAGO CON POTENCIAL USO COMO ANTIMICROBIANO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Ana Magdalena¹, Márcia Braz², Valeria Ruffo³, Lucía Fernández¹, Pilar García¹

¹ Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.

² Universidad de Aveiro, Portugal.

³ Universidad de Copenhague, Dinamarca.

ana.magdalena@ipla.csic.es

Dentro de la seguridad alimentaria, las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados representan un riesgo notable tanto para el consumidor como para la industria. En este contexto, *Staphylococcus aureus* es una de las especies bacterianas patógenas más problemáticas. Con el objetivo de buscar una solución a este problema, se ha profundizado en la investigación en torno al uso de bacteriófagos como antimicrobianos.

A partir de una muestra de aguas residuales proveniente de una E.D.A.R, se aisló el bacteriófago philPLA-LAVI (LAVI) de tipo myovirus. La secuenciación de su genoma mostró que el fago LAVI pertenecía al género *Silviavirus*, y específicamente, a la familia *Herelleviridae*. Cuando se compara con otros bacteriófagos relacionados, mostró un ciclo de infección más corto cuando infecta la cepa V329 de *S. aureus*. Su rango de huésped resultó ser bastante amplio, infectando al 83,7% de las 43 cepas de *S. aureus* que se ensayaron. Además, se demostró la capacidad del fago LAVI de infectar biofilms preformados, así como su estabilidad a temperaturas de hasta 60°C y en un rango de pH de 4 a 11.

Con el interés de conocer sus potenciales aplicaciones como antimicrobiano en la industria alimentaria, se estudió la eficacia de LAVI en leche desnatada UHT contaminada con *S. aureus*. A raíz de los buenos resultados obtenidos en este ensayo (donde se vio una reducción bacteriana de 5 unidades logarítmicas pasadas 24 horas), se realizó un ensayo en quesos a escala de laboratorio también infectados con este microorganismo, en los que se observó una disminución en la población bacteriana de casi 3 unidades logarítmicas después de 2 horas y donde la actividad del fago consiguió mantenerse durante una semana. Todo ello nos permite vislumbrar su potencial como herramienta de biocontrol en el sector lácteo.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, bacteriófago, industria alimentaria

Financiación: Este proyecto ha sido financiado por el proyecto PID2022-140988OB-I00MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE y por la beca FPI PREP2022-000447 (MCIN, España).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Un sistema de restricción-modificación media la defensa a podovirus en una cepa de *Marinomonas mediterranea*

Andrea Martínez-Cazorla, Christian Martínez-Jiménez, Patricia Elío-Lucas, Antonio Sánchez-Amat

Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia
a.martinezcazorla@um.es

Marinomonas mediterranea es una bacteria marina modelo de estudio de los sistemas de defensa frente a bacteriófagos. En la cepa tipo, MMB-1^T, la resistencia a diversos podovirus, está mediada por sistemas CRISPR-Cas de tipo I-F y III-B. Estos cooperan en la defensa (1) y están regulados por mecanismos comunes (2). Se han aislado otras cepas de *M. mediterranea*, incluyendo la cepa MMB-2, resistentes a algunos podovirus a pesar de carecer de los espaciadores necesarios para el reconocimiento de estos fagos, lo cual sugiere que la resistencia se haya mediada por mecanismos alternativos a CRISPR-Cas. Ensayos de conjugación han demostrado que la cepa MMB-2 es la única no manipulable genéticamente, por lo que, para estudiar sus sistemas de defensa, se ha llevado a cabo una mutagénesis con nitrosoguanidina obteniendo mutantes con un incremento en la sensibilidad frente a los podovirus. Un estudio comparativo de los genomas de estos mutantes ha revelado que todos ellos están mutados en un operón contenido en un sistema de restricción-modificación de tipo I, aunque presenta otras endonucleasas accesorias. La cepa MMB-2 contiene metilación 6mA en el motivo AGAGNNNNNGTG/CACNNNNNCTCT. Por último, se han aislado mutantes de podovirus capaces de infectar a MMB-2, cuyo análisis genómico ha revelado que presentan mutaciones puntuales o delecciones que afectan precisamente al motivo conservado reconocido por el sistema de tipo I de la cepa MMB-2. Los datos indican que este sistema, ausente en otras cepas de *M. mediterránea*, es el responsable de la resistencia a podovirus.

Bibliografía:

1. Silas, S. et al. *Elife* 2017 6:e27601
2. Lucas-Elío, P. et al. *Sci Rep.* 2021 11(1):1–13

Palabras clave: *Marinomonas mediterranea*, bacteriófagos, mecanismos de defensa, CRISPR-Cas, restricción-modificación.

Financiación:

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2021-124464NB-I00 MCIN/AEI y “FEDER, Una manera de hacer Europa”, así como por contratos predoctorales del Plan Propio de Fomento de la Investigación de la Universidad de Murcia a A. M.-C. y C.-M.-J.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Estudio de la diversidad de profagos en *Xylella fastidiosa*.

Miranda Tomás¹, María del Pilar Velasco-Amo², Luis F. Arias-Giraldo², Ester Marco-Noales³, Blanca Landa², Pilar Domingo-Calap¹

1 Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Universidad de Valencia - CSIC, 46980, Paterna, Valencia

2 Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 14004, Córdoba.

3 Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315 km 10.7, 46113, Moncada, Valencia.

miranda.tomas@uv.es

Xylella fastidiosa es una bacteria fitopatógena que coloniza los vasos del xilema de diferentes plantas hospedadoras, pudiendo causar pérdidas significativas en agricultura. Esta bacteria contiene elementos genéticos autorreplicativos, como los profagos, que pueden transmitirse entre especies a través de transferencia horizontal de genes y conferir nuevos rasgos de virulencia. Por tanto, la identificación y caracterización de profagos en los genomas de *X. fastidiosa* podría proporcionar información importante en estudios de epidemiología, ecología y evolución de esta bacteria patógena, así como una alternativa para su control mediante terapia de fagos. El objetivo de este estudio es predecir y analizar, con herramientas bioinformáticas, la diversidad de profagos en cepas de las tres subespecies principales de esta bacteria: *fastidiosa*, *multiplex* y *pauca*. Los resultados mostraron una gran cantidad de profagos integrados en los genomas de *X. fastidiosa*, siendo algunos de ellos capaces de infectar diferentes cepas de la misma subespecie, lo que sugiere la posibilidad de transferencia horizontal de genes entre ellas. También se hallaron similitudes genómicas entre profagos integrados en genomas de cepas de diferente subespecies, lo que refuerza la idea de procesos evolutivos compartidos. Además, se identificaron profagos tanto integrados en el cromosoma como de forma episomal, lo que podría proporcionar ventajas evolutivas y mecanismos de defensa a la bacteria. Estos hallazgos pueden contribuir a comprender el papel de los profagos en la virulencia y adaptación de *X. fastidiosa* a diferentes hospedadores, mejorando el conocimiento sobre la epidemiología y evolución de esta bacteria, así como aportar nuevas estrategias para su control.

Palabras clave: profagos, *Xylella fastidiosa*, terapia de fagos

Financiación: Esta investigación formó parte de los proyectos: TED2021-130110B-C42, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033, NextGenerationEU/PRTR de la Unión Europea; el proyecto HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01 BeXyl (*Beyond Xylella, Integrated Management Strategies for Mitigating Xylella fastidiosa impact in Europe*; número de identificación: 101060593); y el contrato Ramón y Cajal RYC2019-028015-I financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, ESF *Invest in your future*.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

OPTIMIZACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PCR-ACTIVATED SORTING PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES VIRUS-HOSPEDADOR

Laura Pérez-Martín¹, Borja Aldeguer-Riquelme¹, Aurelio Hidalgo², Josefa Antón¹
Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante,
Alicante¹
Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis, CSIC, Campus Universidad
Autónoma, Madrid²

laura.perezmartin@ua.es

El estudio de los virus y sus hospedadores microbianos es de gran relevancia dada la influencia de éstos en los ciclos biogeoquímicos y en el control del número, la diversidad y la evolución de los microorganismos. Asimismo, las partículas víricas pueden actuar como vectores para la transferencia horizontal de algunos genes relevantes a escala global. Sin embargo, la naturaleza de estas partículas y sus hospedadores bacterianos son en su mayoría desconocidas debido a limitaciones en su cultivo. Por ello, este trabajo plantea las metodologías de ultra-alto rendimiento, como la microfluídica, como solución a estas limitaciones.

La tecnología de microfluídica basada en *PCR-activated sorting* consiste en la encapsulación individual de células en gotas de aceite, junto con cebadores y una sonda TaqMan, específicos de una región genómica del microorganismo de interés. Las células encapsuladas se someten a una PCR digital en gota (ddPCR) y, tras la amplificación, se separan en función de la fluorescencia emitida. Esta técnica, por consiguiente, permite el enriquecimiento de poblaciones de virus-hospedador seleccionadas, para análisis posteriores, sin necesidad de cultivo.

La optimización se está llevando a cabo con muestras procedentes de biomas sometidos a diferentes grados de impacto antropogénico: agua de mar de Cabo Huertas (Alicante), sedimento del Mar Menor (Murcia) y agua de entrada de una EDAR. Para establecer los límites de la técnica, se está empleando *Vibrio coralliilyticus* como sistema modelo, añadiéndolo y recuperándolo de la población natural.

Actualmente se está trabajando en la mejora del *sorting* centrándonos en la estabilidad de la emulsión y la eficacia de la ddPCR.

Palabras clave: Virus-hospedador, Microfluídica, ddPCR, *sorting*.

Financiación: CIPROM/2021/006 - "New Strategies To Study Virus-Host Interactions From Humans To The Ecosystem: A "One-Health" Perspective (VIRHOS)"



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Colección de bacteriófagos frente a *Xylella fastidiosa*

Carlos Selles-Ribera, Miriam Simó-Esquivel, María Luisa Domingo-Calap, Pilar Domingo-Calap, Ester Marco-Noales

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia
Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), Universitat de València-CSIC,
Paterna, Valencia
selles_carrib@gva.es

Xylella fastidiosa (*Xf*) es una bacteria fitopatógena emergente en el sur de Europa, causante de diversas enfermedades que amenazan cultivos de importancia estratégica para los países mediterráneos como la vid, los cítricos, los frutales de hueso y el almendro. Vive en el xilema de la planta hospedadora y es transmitida por insectos que se alimentan de la savia bruta. Actualmente, no se dispone de métodos eficientes y sostenibles para una gestión integrada de *Xf*, recurriendo en la mayoría de los casos a la erradicación de los árboles infectados y el control de las poblaciones de insectos vectores. El uso de bacteriófagos se postula como un tratamiento ecológicamente sostenible para el biocontrol de *Xf*, que constituye una alternativa o un complemento a otras estrategias. En este estudio, a partir de diferentes aguas residuales, se han aislado y caracterizado aproximadamente 40 nuevos fagos con capacidad lítica frente a cepas de *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* de las Islas Baleares. La capacidad infectiva de estos fagos ha sido comprobada mediante ensayos en medio semisólido y líquido, obteniéndose calvas de diversas morfologías y tamaños en placa que se corresponden con una inhibición total o parcial del crecimiento en medio líquido, dependiente de la dosis de fago y la ratio fago:bacteria. Actualmente se está llevando a cabo la caracterización genética de todos estos fagos mediante secuenciación en la plataforma MiniSeq.

Palabras clave: *Xylella fastidiosa*, bacteriófago, biocontrol, tratamiento, secuenciación, infección

Financiación: Este trabajo se está desarrollando con la financiación del proyecto europeo HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01 BeXyl (Grant ID No 101060593), el proyecto TED2021-130110B-C42, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU /PRTR, y el proyecto IVIA-GVA 52202 - SOSTENIBLE- del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Proyecto susceptible de ser cofinanciado por la Unión Europea a través del programa operativo FEDER Comunitat Valenciana 2021-2027).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Efectos del contexto biológico en la ecología y evolución de un par virus-hospedador

Rodrigo Sanchez-Martinez¹, Laura Medina-Ruiz², Jonás Sarasa², María Enciso², Fernando Santos¹, Josefa Antón¹

1 - Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, San Vicent del Raspeig, Alicante, España

2 - IGES, Alicante, España

rodrigo.sanchez@ua.es

Los virus desempeñan un papel fundamental en la ecología y evolución de los ambientes naturales, afectando a la composición, función y desarrollo de las comunidades microbianas. Además, presentan prometedoras aplicaciones como, por ejemplo, la manipulación de dichas comunidades de forma dirigida. Para comprender mejor las funciones de los virus en los ecosistemas naturales y optimizar su utilidad en la ingeniería de ecosistemas, es crucial comprender a fondo cómo interactúan con sus hospedadores, tanto en experimentos de laboratorio como en entornos naturales. Sin embargo, la mayoría de trabajos sobre la ecología y evolución virus-hospedador han tendido a emplear predominantemente dos enfoques metodológicos: experimentos con comunidades altamente simplificadas (pares virus-hospedador aislados) o experimentos en el seno de comunidades complejas. En este estudio, hemos llevado a cabo experimentos de laboratorio utilizando la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (cepa M1) y el virus EM1, para investigar cómo la presencia de una comunidad con varios grados de complejidad puede influir en sus interacciones.

Nuestros resultados muestran que la presencia de otras cepas de *Sal. ruber*, que no son infectadas por el virus, conduce a una reducción en la producción de virus por parte de M1. Además, al aumentar la complejidad microbiana, añadiendo también virus que infectan a estas cepas (pero no a M1), esta influencia se amplifica, disminuyendo aún más la producción de EM1. Este componente biótico tiene un efecto también en la evolución del par, que presenta un mayor número de mutaciones con el aumento de la complejidad. Se resalta así la necesidad de realizar más estudios experimentales que abarquen diferentes niveles de complejidad biológica para comprender mejor estas dinámicas, y de esta forma tener un mejor enfoque de cómo interactúan virus y procariotas en la naturaleza.

Palabras clave: *Salinibacter ruber*, ambientes hipersalinos, halovirus

Financiación: Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (METACIRCLE PID2021-126114NB-C41)



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 3: Bacteriófagos en alimentos

Fagoterapia en la industria láctea: una solución sostenible contra los biofilms de *Staphylococcus aureus*

Seila Agún, Lucía Fernández, Ana Rodríguez, Pilar García

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n
33300 - Villaviciosa, Asturias, Spain

DairySafe Group. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain.

Seila.agun@ipla.csic.es

La presencia de biofilms de *Staphylococcus aureus* en la industria láctea representa un desafío importante para la seguridad alimentaria, lo que hace imprescindible desarrollar nuevas estrategias de control. En este contexto, el uso de bacteriófagos y sus proteínas surge como una solución innovadora para eliminar biofilms en entornos alimentarios. En este estudio, evaluamos la eficacia de la endolisina LysRODIΔAmi y del bacteriófago philPLA-RODI contra biofilms de *S. aureus* formados en leche, un sustrato relevante en la industria láctea. Nuestros resultados muestran que, aunque los biofilms se forman robustamente tanto en leche como en medio de cultivo, aquellos desarrollados en leche son más resistentes al tratamiento con endolisina, destacando la complejidad de tratar biofilms en matrices alimentarias. Sin embargo, el bacteriófago philPLA-RODI fue más eficaz en la reducción del número de células en los biofilms formados en leche, subrayando el potencial de la fagoterapia como una herramienta eficaz para la seguridad alimentaria. Además, la combinación de philPLA-RODI y LysRODIΔAmi mostró resultados prometedores, especialmente como medida preventiva del desarrollo de biopelículas de *S. aureus* sobre superficies en el sector lácteo. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de adaptar el biocontrol con fagos a los entornos específicos de la industria alimentaria, ofreciendo una alternativa sostenible y efectiva a los antimicrobianos convencionales.

Palabras clave: Bacteriófagos, endolisinas, industria láctea, seguridad alimentaria, biofilms, *Staphylococcus aureus*

Financiación:

Este trabajo está financiado por el proyecto PID2022-140988OB-I00 del MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE y por la beca FPI PRE2020-093719 (Ministerio de Ciencia e Innovación, España).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Un polisacárido que bloquea la infección de *Lactococcus lactis* por *Ceduovirus*

Claudia Rendueles¹, Javier Nicolas Garay-Novillo²; José Ángel Ruiz-Masó³; Ana Rodríguez¹; Gloria del Solar³; José Luis Barra²; Beatriz Martínez¹

¹ Grupo DairySafe. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC. Paseo Rio Linares s/n. 33300 Villaviciosa, Asturias, España

² Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), CONICET - DQBRC, FCQ, UNC. Córdoba, Argentina

³ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CIB), CSIC. Madrid, España.

bmf1@ipla.csic.es

La presencia de bacteriófagos que infectan a los cultivos iniciadores en las fermentaciones lácteas supone un problema de gran relevancia, al dar lugar a fermentaciones fallidas o de mala calidad. Es constante, por tanto, la búsqueda de cepas resistentes a fagos.

En experimentos de evolución adaptativa en presencia de la bacteriocina lactococcina 972 se seleccionaron clones de *Lactococcus lactis* resistentes a dicha bacteriocina que, por el contrario, resultaron ser más sensibles a fagos de tipo c2 (*Ceduovirus*) que sus ancestros. Todos ellos comparten la pérdida de un plásmido de 41 kb (p41) que codifica un posible exopolisacárido, aunque la presencia de otras mutaciones adicionales no permitió asociar de forma directa esta pérdida con el fenotipo de sensibilidad a fagos.

En este trabajo estudiamos la infección por el fago c2 del clon *L. lactis* (IPLA1064-WT) y sus derivados (C11 y E11), confirmando una mayor sensibilidad tanto en medio sólido (eficiencia de plaqueo) como en medio líquido (porcentaje de inhibición). Determinamos, además, diferencias significativas en el porcentaje de adsorción, con valores del 40 % en la cepa parental y del 75 % en las derivadas.

Finalmente, empleando el sistema CRISPR-Cas9, eliminamos de forma selectiva el plásmido p41. En este mutante, la eficiencia de plaqueo resulta equiparable a la obtenida en los derivados C11 y E11. Estos resultados confirman la implicación de este polisacárido en el bloqueo de la infección de *L. lactis* por *Ceduovirus*, al bloquear su adsorción, y abren la puerta a futuros trabajos que permitan profundizar en sus propiedades físico-químicas y tecnológicas.

Palabras clave: bacterias lácticas; Infección fágica: resistencia; adsorción; plásmido; edición CRISPR/Cas

Financiación: PID2020-119697RB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033); AYUDAS SEVERO OCHOA (BP20 006); AYUDAS CESAR NOMBELA (CN-SEM-2024-005)



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

CRISPR-Cas9 engineering of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* to deliver the endolysin Ply511 against *L. monocytogenes*, a proof of concept.

David Sáez Moreno¹

1. Univesidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal

2. LABBELS associate laboratory, Braga / Guimaraes, Portugal ¹

e-mail: david_gamonal95@hotmail.com

Other authors:, João Paulo Carvalho ¹, Joana Cunha ^{1,2}, Luís Daniel Rodrigues de Melo ^{1,2}, Lucília Domingues ^{1,2}, Joana Azeredo ^{1,2}

1. Univesidade do Minho, Centre of Biological Engineering, Braga, Portugal

2. LABBELS associate laboratory, Braga / Guimaraes, Portugal

In this study, we investigate the efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. boulardii* to deliver the endolysin Ply511 against *Listeria monocytogenes* as a proof of concept, towards an engineered probiotic. *L. monocytogenes* is a Gram-positive pathogen causative of human infections, resulting in febrile gastroenteritis, perinatal infection, and central nervous system infections. These infections are frequently acquired through the ingestion of contaminated food. Endolysins, bacteriophage-derived enzymes, have emerged as promising antimicrobial agents due to their ability to specifically target and degrade bacterial cell walls.

We employed CRISPR-Cas9 to genetically modify both yeasts to display or secrete the endolysin Ply511, integrating in different chromosomes. The expression of the genetic construction and the enzymatic activity of the engineered yeast against heat-killed cells were confirmed. In killing assays, the modified *S. cerevisiae* achieved a reduction in *L. monocytogenes*, with the yeast secreting Ply511 showing a superior activity than the display. The spent supernatants containing the endolysin were also recovered and could reduce *L. monocytogenes*, which represents the first time this endolysin shows activity in spent supernatant.

We demonstrate the potential of genetically engineered *S. cerevisiae* and *S. boulardii* to secrete endolysins as a promising approach for targeting gut pathogens. Future efforts will focus on utilizing *Saccharomyces boulardii* as a probiotic delivery system to ensure efficient in vivo delivery of endolysins to the gut, thus advancing towards a viable engineered probiotic solution for preventing bacterial infections.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 4. Bacteriófagos en producción primaria

A Novel DUF4238-Containing Protein Confers Defence Against the Autographiviridae Phage UAB_Phi78 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Pau Conill-Bonet, María Pérez-Varela, Pilar Cortés, Jordi Barbé, Montserrat Llagostera and Susana Campoy*

Molecular Microbiology Group, Genetics and Microbiology Department at the School of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus Bellaterra, Cerdanyola del Vallès.

Susana.Campoy@uab.cat

One of the major health challenges today is combating the widespread rise of bacterial resistance to antibiotics. Bacteriophage therapy is a promising strategy to address this global concern. However, bacteria can also evolve resistance and develop defence mechanisms against phages. The emergence of resistance and interference mechanisms to phage infection can hinder the success of bacteriophage-based applications. In this study, we investigate a novel phage interference mechanism encoded by the *orf8* gene of the pUA1135 plasmid, a large conjugative vector acquired by *Salmonella enterica* isolates obtained from ceca of broilers contaminated with *Salmonella* and treated with a phage cocktail (composed by three phages: UAB_Phi20, UAB_Phi78 and UAB_Phi87)

The *orf8* encodes a hypothetical protein predicted to contain a DUF4238 domain, with no similarity to any known phage defence system. Our results indicate that the expression of *orf8* acts as an interference mechanism against UAB_Phi78, a strictly virulent phage of the family *Autographiviridae*. Additionally, the presence of Orf8 induces growth arrest in infected cells and seems to alter the transcriptional profile of the UAB_Phi78 genes. We have also identified spontaneous UAB_Phi78 mutants capable of evading this defence system; all mutants present amino acid changes at either Pro726 or Leu728 in the phage RNA Polymerase *gp12*, both residues located in an external structural pocket of this RNAPol.

Understanding the molecular mechanisms underlying bacterial phage defence systems will enhance our knowledge of host-pathogen interactions and aid in the development of more robust and efficient phage therapies.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 5: Terapia fágica

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

Iván Andrés-Tarazón¹, Patricia Bernabé-Quispe¹, Samara Sabsabi¹, Rosa Ana Espada¹, Mª del Pilar Marin², Irene Cruz¹, Marina Costa¹, Pablo Taberner-Pérez^{1,3} y Mª Ángeles Tormo-Mas^{1,3}.

¹Grupo de Infección Grave, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IISLaFe).

²Unidad de Microscopía IISLaFe. ³Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

guimariwa@gmail.com

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de graves infecciones nosocomiales que afectan principalmente a pacientes immunocomprometidos, oncológicos, quirúrgicos, quemados y con fibrosis quística. La existencia de cepas multirresistentes y la capacidad de formar biofilms disminuyen significativamente la efectividad de los antibióticos, convirtiendo a esta bacteria en un importante problema de salud pública a nivel mundial.

En este contexto, la fagoterapia se presenta como una alternativa prometedora para el biocontrol de estas infecciones, cuyo potencial terapéutico radica en la capacidad de los bacteriófagos líticos para infectar y lisar de forma específica a las bacterias patógenas. Además, su versatilidad permite explorar combinaciones sinérgicas que potencian la acción bactericida de otras estrategias antimicrobianas. En este trabajo, se ha realizado una bioprospección a partir de aguas ambientales y residuales de fagos específicos frente a cepas de *P. aeruginosa* con diferente susceptibilidad antibótica, aisladas de pacientes del Hospital Universitari i Politècnic La Fe. La caracterización de los diferentes fagos aislados incluyó: obtención de matrices que reflejan el rango de hospedador; determinación de la morfología viral mediante microscopía electrónica de transmisión; estudio del impacto de la temperatura y el pH sobre la capacidad infectiva; y secuenciación y análisis bioinformático del genoma completo para determinar el ciclo vital y comprobar la ausencia de genes de virulencia, de toxinas o de resistencia a antibióticos. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de una selección de fagos candidatos para inhibir el crecimiento bacteriano en medio líquido, y prevenir la formación y eliminar biofilms.

Los resultados obtenidos subrayan la importancia de la caracterización *in vitro* para la selección de fagos líticos adecuados para su uso en fagoterapia, y contribuyen a la expansión de las fagotecas existentes que faciliten el desarrollo de futuras terapias fágicas personalizadas en beneficio de los pacientes.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia antibótica, cepas clínicas, bacteriófago, fagoterapia, biofilm.

Financiación: Proyecto PID2021-122875OB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Caracterización de bacteriófagos de *Staphylococcus epidermidis* para prevenir y/o controlar biopelículas bacterianas en catéteres.

Elena G. Biosca¹, Ricardo Delgado-Santander¹, Àngela Figàs-Segura¹, Juan Frasquet-Artes², Luis Martínez-Dolz³, José Luis Díez-Gil³ y Paula Ramírez-Galleymore⁴

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

³Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia-Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERCV).

⁴Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia
elena.biosca@uv.es

La multirresistencia a los antibióticos en las bacterias patógenas del ser humano es una grave y creciente amenaza para la salud pública a nivel mundial, y particularmente en pacientes que precisan de dispositivos médicos endovasculares. Las bacteriemias relacionadas con catéteres (BRC) causan una elevada morbilidad y mortalidad. Su base etiopatogénica es la formación de biopelículas bacterianas en los catéteres. El tratamiento de estas infecciones es especialmente difícil debido a la protección que la biopelícula confiere a las bacterias y a su resistencia a la mayoría de los antibióticos actuales. Por consiguiente, es preciso explorar nuevas terapias alternativas más eficaces que las actuales para impedir la formación de la biopelícula bacteriana y/o eliminar la biopelícula establecida. Las BRC suelen estar causadas por estafilococos coagulasa negativos, como *Staphylococcus epidermidis*, que suelen ser resistentes a todos los betalactámicos, por lo que son escasos los compuestos antimicrobianos eficaces. La terapia con virus bacteriófagos (fagos) puede ser una alternativa por su elevada especificidad y capacidad de penetrar las biopelículas y degradarlas. Sin embargo, hay pocos estudios sobre su aplicación para eliminar las biopelículas de estos patógenos. En este trabajo se han aislado y caracterizado fagos de cepas clínicas de *S. epidermidis* causantes de BRC para determinar su capacidad, solos o combinados, para prevenir y/o controlar la formación de biopelículas en microplaca y en modelo de catéter. Los resultados han permitido obtener un cóctel de fagos específicos con actividad lítica y antibiopelícula frente a cepas de *S. epidermidis* causantes de BRC, para su aplicación en la prevención y/o control de estas infecciones.

Palabras clave: multiresistencia, biopelícula, bacteriemia, terapia fágica, actividad lítica, actividad antibiopelícula

Financiación: PROGRAMA VLC-BIOMED (FAGOTERAPIA-GONZALEZ-RAMIREZ-2015 A y 2016B) y Proyecto AICO/2021/261 de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana.

Agradecimientos: A la OTRI de la Universitat de València.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

ESTUDIO DE FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD AL FAGO *Kayvirus rodi* EN DISTINTAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Andrea Jurado¹, Daniel López², Ana Rodríguez¹, Lucía Fernández¹, Pilar García¹
andrea.jurado@ipla.csic.es

¹Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, España

²Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, España

Los bacteriófagos se consideran actualmente como una herramienta novedosa para combatir las infecciones e intoxicaciones asociadas al patógeno *Staphylococcus aureus*. En este trabajo se realizó un análisis genotípico y fenotípico de una colección de 18 cepas de *S. aureus* con distintos orígenes (clínico, leche de vacas con mastitis, industria láctea e industria cárnica) con el objetivo de identificar determinantes de susceptibilidad al fago *Kayvirus rodi*. Todas las cepas analizadas mostraron susceptibilidad aunque en distinto grado, siendo las de procedencia clínica las más resistentes. En cuanto a la caracterización genética, todas las cepas presentaron sistemas de defensa antifagos (Abi2, restricción-modificación, AVAST, Thoeris, etc.), si bien la correlación directa entre su posesión y la resistencia al fago es difícil sin estudios adicionales. Además, se estudió la presencia de genes implicados en la síntesis de la cápsula y de los ácidos teicoicos, genes que juegan un papel en la adsorción de fagos que infectan a *S. aureus*. En concreto, se identificó una correlación entre la presencia de un gen *tarM* intacto, implicado en la modificación de los ácidos teicoicos, y la producción de cápsula con la susceptibilidad al fago. La presencia en los ácidos teicoicos del residuo añadido por TarM se asoció a una mayor resistencia en la adsorción del fago phi IPLA-RODI, por el contrario, se observó que la modificación incorporada por TarS la facilitaba y su ausencia disminuía la susceptibilidad al fago. Por otro lado, se determinó que el factor sigma alternativo SigB participa en la regulación de la resistencia a *K. rodi* en algunas cepas. No obstante, son necesarios nuevos experimentos que permitan confirmar cuáles son los mecanismos y/o sistemas de regulación que expliquen la diferencia de susceptibilidad al fago. Los datos obtenidos en el presente estudio serán útiles para identificar qué determinantes genéticos pueden afectar el éxito de la terapia fágica frente a este microorganismo.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Kayvirus rodi*, mecanismos de resistencia a fagos

Financiación: Proyecto PID2022-140988OB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Aislamiento de fagos del patógeno de peces *Tenacibaculum*.

García-Cervera, Marina; Campillo-Brocal, Jonatan C.; Martínez-Cazorla, Andrea; Sánchez-Amat; Antonio
Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia
m.garciacervera@um.es

La tenacibaculosis es una infección generada por diferentes especies bacterianas del género *Tenacibaculum* que causa importantes pérdidas en plantas de acuicultura en el mundo. Al igual que con otras enfermedades bacterianas en acuicultura, la terapia fágica ha surgido como una herramienta de interés para el control de la tenacibaculosis. Sin embargo, son muy pocos los fagos descritos con anterioridad a este trabajo que infectan a este género. Por ejemplo, sobre fagos de *T. maritimum* solo se ha publicado un estudio en el que se describió el aislamiento de varios myovirus muy similares entre sí. En el caso de *T. soleae* no se ha comunicado el aislamiento de fagos que la infecten. En este trabajo se ha conseguido aislar 3 fagos muy similares entre sí a nivel genómico que infectan a *T. maritimum* y que se diferencian notablemente a nivel genómico de los fagos de esta especie previamente descritos. Asimismo, se ha conseguido el aislamiento por primera vez de un fago que infecta a *T. soleae*. El aislamiento de estos fagos, y de otros que puedan ser aislados en el futuro, podría contribuir al desarrollo de la terapia de fagos como mecanismo de control de la tenacibaculosis.

Palabras clave: *Tenacibaculum* sp., patógeno peces, bacteriófagos.

Agradecimientos: Cooke España por suministrar cepas de *Tenacibaculum* y muestras de agua para el aislamiento de fagos.

Financiación: Este estudio forma parte del programa ThinkInAzul y ha sido financiado por el MCIU con fondos de la Unión Europea NextGeneration EU (PRTR-C17.11) y por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia - Fundación Séneca.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Creación de la primera Fagoteca española. FAGOTECA ONE HEALTH.

Aida Martín^{1,3}, Víctor Ladero^{1,3}, Lucía Fernández^{1,3}, Mario F. Fraga^{2,3} y Pilar García^{1,3}

¹Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC

²Centro de Investigación en Nanomateriales y Nanotecnología CINN-CSIC

³Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)

Aida.martin@ipla.csic.es; fagoteca@ipla.csic.es

La actual crisis de resistencia a los antibióticos ha promovido la búsqueda de soluciones urgentes para tratar enfermedades infecciosas. La Terapia Fágica y el biocontrol se vislumbra como una solución factible y aplicable a muy corto plazo. La Fagoteca OneHealth tiene como objetivo seleccionar bacteriófagos frente a bacterias no deseables (o multirresistentes) en diferentes ambientes (veterinaria, agricultura, espacios naturales, clínica humana), para ser utilizados como agentes antimicrobianos alternativos a los antibióticos. Nuestro objetivo también incluye la creación de herramientas para la elaboración de fagogramas digitales que permitan la optimización de las mezclas fágicas.

En el momento actual, la colección dispone de 61 fagos frente a un total de 21 especies bacterianas (*Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, y *Enterococcus spp.*, entre otras). Además, a través de nuestro servicio se puede disponer de material aislado por laboratorios colaboradores. En concreto, más de 700 fagos que infectan a 22 especies bacterianas. Nuestra prioridad es aislar nuevos fagos y llevar a cabo una caracterización completa a nivel genómico y funcional, centrándose fundamentalmente en los patógenos seleccionados como prioritarios por la OMS.

Como complemento a lo anterior, se ofrecen servicios relacionados con la conservación de bacteriófagos/cepas huésped, aislamiento e identificación de nuevos fagos, propagación y purificación, secuenciación y análisis, y determinación de rango de huésped y patrones de sensibilidad de bacterias a fagos. Además, se dispone de un servicio de consultoría y asesoramiento en todos los aspectos relacionados con el manejo de bacteriófagos.

Palabras clave: bacteriófagos, terapia fágica, antimicrobianos, fagoteca, one health,

Financiación: Proyecto Intramural PIE. Referencia 202470E016. Ministerio de Ciencia e Innovación.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

@AdoptaunFago: investigación traslacional en fagoterapia

Marco Pardo-Freire, Mireia Bernabéu-Gimeno, Lucas Mora-Quilis, Miranda Tomás, Pilar Domingo-Calap

Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Universidad de Valencia-CSIC, Paterna 46980, España

marco.pardo@uv.es

La multirresistencia bacteriana es un problema de salud global y una de las alternativas más prometedoras son los fagos. En España, su uso clínico está limitado al contexto de terapia compasiva siendo la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) responsable de la autorización de los tratamientos. Tras la puesta a punto de un protocolo para la producción de fagos en España aprobado por la AEMPS, generamos preparaciones terapéuticas de fagos conteniendo 10^8 - 10^{10} partículas virales. Estos viales se han utilizado, hasta el momento, en más de una docena de tratamientos compasivos. Hasta la fecha se han utilizado 6 fagos diferentes para tratamientos contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium abscessus* y *Klebsiella pneumoniae*. Las vías de administración han sido nebulizada, intravenosa o local, dependiendo de la infección. El seguimiento de los pacientes incluye el análisis de indicadores clínicos, recuentos bacterianos, susceptibilidad bacteriana al fago y antibióticos, detección de fago y respuesta inmunitaria. En ningún caso se han descrito efectos adversos. Este trabajo muestra el potencial de la fagoterapia y la necesidad de ensayos clínicos para avanzar hacia su uso generalizado en nuestro país.

Palabras clave: terapia fágica, resistencia antibióticos, tratamiento compasivo

Financiación:

El proyecto ha sido financiado mediante crowdfunding en colaboración con la Fundación Española de Fibrosis Quística, el Proyecto SEJIGENT/2021/014 (Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital; Generalitat Valenciana), el Proyecto PID2020-112835RA-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades), y el contrato Ramón y Cajal RYC2019-028015-I (Ministerio de Investigación e Innovación).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Identificación de aislados procedentes de infecciones intramamarias y susceptibilidad al biocontrol con bacteriófagos.

Rafael Tabla Sevillano¹, Felipe Roberto Molina Rodríguez², María Vizcaíno

Rodríguez¹, Alfredo García Sánchez¹, Joaquín Rodríguez Pinilla¹

1. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-INTAEX), Badajoz, España.

2. Universidad de Extremadura, Facultad de Ciencias, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Badajoz, España

rafael.tabla@juntaex.es

Existen una gran variedad de microorganismos implicados en la aparición de infecciones intramamarias (IMIs) en pequeños rumiantes. Entre ellos las especies pertenecientes al género *Staphylococcus* son las más habitualmente asociadas a la aparición de mastitis en cabras, siendo especialmente relevante *S.aureus*. La práctica veterinaria más extendida para el tratamiento de la mastitis es la administración de antibióticos, sin embargo, la creciente aparición de resistencias requiere el desarrollo de estrategias alternativas. En este sentido la fagoterapia puede constituir una potente herramienta para el biocontrol de estos microorganismos causantes de mastitis.

El objetivo de este trabajo ha sido identificar las especies de *Staphylococcus* causantes de IMIs en animales pertenecientes a tres explotaciones caprinas de Extremadura y determinar su sensibilidad frente bacteriófagos. La identificación de las especies bacterianas se realizó mediante la secuenciación parcial del gen *rpoB*. Los bacteriófagos fueron obtenidos a partir de aguas residuales procedentes de Extremadura. El aislamiento de los bacteriófagos se realizó frente a *S. aureus*, aunque el rango de hospedador fue determinado mediante cruce de estrías sobre las diferentes especies de *Staphylococcus* aisladas.

La prevalencia de IMIs por presuntos estafilococos en los animales analizados fue del 52,94%. A partir de las placas que mostraron crecimiento se aislaron 109 cepas de presuntos estafilococos. Se consiguió identificar el 95.42% de los aislados que fueron agrupados en 20 especies. *Mammaliicoccus latus* fue la especie aislada con mayor frecuencia seguida de *S. equorum* y *S. chromogenes*. *S. aureus* supuso el 4.59% de los aislados. La distribución de las especies fue desigual entre los rebaños analizados mostrando cada uno de ellos una especie predominante diferente. Los fagos Φ 156b, Φ 193 y Φ 194b mostraron un amplio rango de actividad frente a las especies mayoritarias. El fago Φ 105 exhibió una elevada especificidad presentando únicamente actividad lítica frente *S. aureus*.

Palabras clave: Infección intramamaria, mastitis, estafilococos, bacteriófagos.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto IB20113, con cofinanciación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Determinantes genéticos asociados con el rango de hospedador de fagos de *Staphylococcus epidermidis*

Carlos Valdivia¹⁺, Pilar Domingo-Calap¹, Raquel Martínez-Recio¹, David Negus², Jonathan Thomas².

1- Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Universidad de Valencia-CSIC, Paterna 46980, España

2- School of Science & Technology, Nottingham Trent University, Nottingham, United Kingdom.

carlos.valdivia@uv.es

Las bacterias formadoras de biofilm causan infecciones de difícil tratamiento debido a su especial resistencia a antibióticos y desinfectantes. El biofilm facilita su adhesión a distintos materiales empleados en entornos clínicos e industriales, lo que complica aún más su erradicación. *Staphylococcus epidermidis*, por su naturaleza comensal y capacidad de formar biofilm, es un patógeno destacado en infecciones relacionadas con dispositivos médicos, como catéteres y prótesis. Las contaminaciones en estos dispositivos suelen requerir su sustitución, con las complicaciones asociadas que conlleva. Esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias alternativas a los antibióticos para su eliminación. Los bacteriófagos, o fagos, se proponen como una solución prometedora por su capacidad para eliminar estas poblaciones bacterianas. Para esto es posible la aplicación como terapia del virus completo o de enzimas virales, capaces de degradar tanto la bacteria como la matriz del biofilm. En este trabajo se aislaron cuatro bacteriófagos de amplio espectro con muy elevada similitud genómica. Al evaluarlos sobre una colección de *S. epidermidis*, observamos dos rangos de hospedadores notablemente distintos y los principales factores implicados fueron identificados a través de la caracterización genómica de bacterias y fagos. El análisis de estos fagos, con potencial en fagoterapia y relacionados con otros previamente utilizados, representa un avance en la comprensión de los factores que influyen en el rango de hospedador de los bacteriófagos.

Palabras clave: *Staphylococcus*, *Staphylococcus epidermidis*, bacteriófagos, terapia fágica

Financiación: III International Zendal Awards Human Health.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos frente a cepas clínicas de *Escherichia coli*.

Rosa Vázquez¹, José F. Català-Senent¹, Juan Frasquet-Artes², Paula Ramírez-Galleymore³ y Elena G. Biosca¹

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico la Fe, Valencia.

³Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario y Politécnico la Fe, Valencia.
elenabiosca@uv.es

Escherichia coli es la especie bacteriana comensal más frecuente de la microbiota intestinal humana, aunque algunas cepas son patógenas y capaces de causar infecciosas graves en el ser humano. Es una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Las cepas de *E. coli* multirresistentes a los antibióticos suponen un riesgo considerable para el sistema sanitario mundial. Actualmente existe un renovado interés por el desarrollo de tratamientos alternativos como la fagoterapia o el uso de virus bacteriófagos (fagos) con fines terapéuticos. El objetivo del presente trabajo ha sido aislar y caracterizar fagos líticos frente a cepas clínicas de *E. coli* como posibles agentes terapéuticos. Para ello, se realizaron aislamientos de fagos activos frente a *E. coli* de muestras ambientales y clínicas que se caracterizaron mediante ensayos de rango de hospedadores y especificidad, interacción bacteria-fago *in vitro*, estabilidad térmica y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados mostraron varios fagos capaces de infectar específicamente a cepas clínicas de *E. coli*. Dos de ellos, redujeron las poblaciones bacterianas en medio de cultivo. Se mantuvieron estables a 4°C y preservaron su capacidad lítica a 37°C. La caracterización morfológica permitió su clasificación inicial como pertenecientes a la anterior familia *Podoviridae*. Los análisis genómicos iniciales encuadran uno de ellos dentro del actual género *Xuquattrovirus*.

Palabras clave: *E. coli*, multirresistencia, antibióticos, fagos, fagoterapia, microscopia electrónica.

Financiación:

Proyecto AICO/2021/261 de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Enseñanza activa y búsqueda colaborativa de bacteriófagos frente a las superbacterias (FAGO@VAL.2)

Elena G Biosca¹, Rosa Vázquez¹, Sergi Maicas¹, Belén Fouz¹, Hortensia Rico¹, Jesús Zueco¹, Ana Pérez-Solsona¹, Belén Álvarez¹, Félix Morán¹, Isabel Salas¹, José F. Català-Senent¹, Juan Frasquet-Artes², Luis Martínez-Dolz³, José Luis Díez³ y Paula Ramírez-Galleymore⁴

¹Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Valencia.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico la Fe, Valencia.

³Servicio de Cardiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia-Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERCV).

⁴Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.
elena.biosca@uv.es

FAGO@VAL, implantado como proyecto piloto de innovación educativa en el curso 2022/23 en la *Universitat de València*, ha continuado en el curso 2023/24. Se centra en la enseñanza activa y la búsqueda colaborativa de bacteriófagos (fagos) que puedan combatir bacterias multirresistentes a los antibióticos (superbacterias). En la segunda edición, FAGO@VAL.2 se ha adaptado a los alumnos de 4º de la ESO para atender a diferentes niveles educativos. Además, no solo se pretende concienciar a la sociedad sobre la amenaza sanitaria global que suponen las superbacterias, sino también divulgar sobre el uso beneficioso de los fagos como estrategia biomédica alternativa para curar infecciones causadas por superbacterias de forma natural, segura y sostenible. El proyecto muestra la diversidad de bacterias y fagos obtenidos por el alumnado en diversos entornos naturales, al tiempo que se centra en el papel de los fagos en la infección y destrucción de bacterias. Se enseña a los estudiantes a aislar fagos de muestras ambientales utilizando una bacteria testigo segura, *Escherichia coli*, y una cepa testigo de otra especie bacteriana diferente, para demostrar la especificidad de los fagos aislados. Posteriormente, los fagos seleccionados se purifican y caracterizan en la universidad para evaluar su potencial actividad antibacteriana frente a cepas de *E. coli* multirresistentes procedentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Con esta investigación posterior se pretende identificar nuevos agentes terapéuticos más respetuosos con la salud y el medio ambiente y en línea con la estrategia “Una sola salud” y los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Palabras clave: innovación educativa, resistencia antimicrobiana, bacterias, fagos, fagoterapia.



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Bloque 6: Herramientas biotecnológicas

DeNovo engineering and accelerated evolution by low-cost valves and continuous-flow syringe

Joaquín Gomis-Cebolla¹, Joseph White¹ and Alfonso Jaramillo¹

¹CSIC-I²SysBio, Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 46980 Paterna, Valencia

joaquin.gomis@csic.es

DeNovoLab aims to develop new general methodologies to engineer living cells with completely new capabilities de novo. To reach our goal we perform “de novo engineering” of organism-specific antibiotics. We use directed evolution of to evolve proteins, enzymes and phage-like particles. We aim at the engineering of antimicrobials devoid of any DNA without requiring to even culture the pathogen, we only require its genomic data. Also we aim to engineering photosynthetic bacteria (cyanobacteria) encoding new genes able to link both reactions while preventing both the inhibition by oxygen and the dissipation of electrons in metabolic reactions. We will employ a novel synthetic biology approach – we call photosynthetic electron focusing – that involves re-engineering the genes involved in photosynthesis and the associated metabolism to completely direct the water-splitting electrons to produce molecular hydrogen.

Palabras clave:

Accelerated evolution, Bioreactor, Phages, Proteins and Enzymes

Financiación:

European Innovation Council. European Commission under EIC Pathfinder Program

La Caixa Foundation. La Caixa Research



VIII REUNIÓN FAGOMA

Valencia, 2024

Lessons learned from a systematic structural-functional characterization of cell wall-binding domains (CBDs) from phage endolysins

Roberto Vázquez, Diana Gutiérrez, Alexandre Boulay, Zoë de Zutter, Dennis Grimon, Bjorn Criel, Lucía Fernández, Ana Rodríguez, Pilar García, Yves Briers
Ghent University, Ghent (Belgium)
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid (Spain)
ravazqf@gmail.com

Endolysins are proteins encoded by phages to lyse bacterial hosts and release their progeny. The complex modular architectures of endolysins, especially in Gram-positive hosts, involve enzymatically active domains (EADs) and CBDs. CBDs are considered crucial for the observed specificity of endolysins when used exogenously as antimicrobials. However, the structural determinants and evolutionary rationale for this specificity remain poorly understood due to the vast CBD diversity and a lack of comprehensive data.

In this work, we mapped the structural-functional diversity of CBDs from staphylococcal, enterococcal and streptococcal phage endolysins. We used computational methods, including metadata-enriched phylogenetic analyses and AlphaFold2-based 3D structure predictions, plus custom tools for endolysin mining and domain delineation to investigate ~150 endolysin sequences for each host. We classified their CBDs into rational groups, uncovering two new families among staphylococcal CBDs, three among enterococcal ones and one among streptococcal ones, many of them displaying SH3b-like folds. GFP-CBD fusion protein libraries were created using the VersaTile DNA assembly technique, and then tested against strain collections to determine binding profiles.

The results demonstrated diverse binding patterns, highlighting the challenges in identifying specificity determinants at a primary structure level without in-depth analysis or larger datasets. This suggests that specificity is not a feature evolutionary sought by the phage, but rather an “accidental” characteristic that arises only when a marginally conserved ligand is present in the preferred bacterial host, and not when an essential and widespread element is used as the CBD ligand.

Palabras clave: endolysins, molecular evolution, protein engineering, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*

Financiación: BOF postdoctoral fellowship 01P10022 (Ghent University), Individual research grant 2024 (ESCMID), Research Foundation—Flanders (FWO) project G066919N and PhD SB fellowship 1S38519N.