

**POLIMORFISMO INTRACROMOSÓMICO DE LOS GENES DEL rRNA 16S Y
PRESENCIA DE GENES RELACIONADOS CON PATOGENICIDAD EN
AISLADOS AMBIENTALES DEL GÉNERO *VIBRIO* EN LA COSTA CHILENA.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en ciencias con mención en Microbiología

Facultad de ciencias

por

Claudia Ximena Moreno Herrera

Mayo, 2002

Director de Tesis: Dr. Romilio Espejo

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

CLAUDIA XIMENA MORENO HERRERA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 6, de Mayo de 2002

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Carlos Jerez

David Holmes

Claudio Vásquez

Víctor Cifuentes

Hay en el cielo de Colombia un coleccionista de nubes ?
Pablo Neruda

A mi madre y hermanos.....

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

-El Dr. Romilio Espejo T., por su respaldo, colaboración y por sus objetivas y acertadas críticas que me permitieron el logro de la tesis.....

A mis compañeros Jaime Romero, Paulina Uribe, Narjol González y la Dr. Mónica Vásquez por sus contribuciones en el desarrollo de este trabajo..

A todo el personal del laboratorio de biotecnología del INTA por su apoyo y amistad.....

A mis amigos por su paciencia y confianza

Al Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) por su financiamiento y colaboración para realizar mis estudios doctorales.....

Y a todos los que colaboraron y apoyaron la realización de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

	PAGINAS
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE MATERIAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUCCION	1
1. Diversidad o polimorfismo de los genes del 16S rRNA.....	1
2. Bacterias del género <i>Vibrio</i>	3
3. Principales Vibrios patógenos.....	4
4. Mecanismos de patogenicidad.	6
5. Ecología de los vibrios marinos.....	8
MATERIALES Y METODOS	11
Cepas y condiciones de cultivo.....	11
Aislados ambientales.....	11
Análisis por Southern blot.....	12
Elución del DNA de geles de agarosa.	13
Extracción de DNA.....	13
Amplificación por PCR.....	13

Análisis de restricción.....	14
Homología del DNA por rapidez de renaturación	15
Análisis de heterodupletes, clonamiento y secuenciación del amplificado del 16S rDNA.....	15
Análisis de secuencia.....	17
Preparación del RNA.....	17
RT Transcripción reversa.....	17
Electroforesis y tinción de ácidos nucleicos.....	18
Caracterización bioquímica.....	18
Aislamiento de fagos y ensayo de actividad lítica.....	19
Multiplicación por infección en medio líquido y obtención de lisados:.....	19
Extracción de formas replicativas.....	20
Ensayos de inducción del profago.....	20
Observación directa del fago por microscopía electrónica.....	20
RESULTADOS	21
1. Capítulo 1. Detección de polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S de <i>Termonobispora bispora</i> por el ensayo de migración del heterodupletes.....	21
2. Capítulo 2. Polimorfismo en el RNA ribosomal 16S obtenido de cultivos clonales de bacterias del género <i>Vibrio</i>	24
2.1. Polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S en bacterias del género <i>Vibrio</i>	24
2.1.1. Polimorfismo en los genes repetidos de RNA ribosomal 16S en cepas tipo	

del género <i>Vibrio</i>	24
2.1.2. Caracterización de los diferentes operones de <i>V. parahaemolyticus</i> : análisis de transferencia a membrana(Southern blot) y clonamiento del rDNA 16S.....	28
2.1.3. Secuenciación del rDNA 16S de los clones de <i>V. parahaemolyticus</i>	30
2.1.4. Polimorfismo en los genes repetidos del RNA ribosomal 16S en aislados ambientales del género <i>Vibrio</i>	32
2.1.5. Clonamiento y secuenciación de los diferentes rDNAs 16S en el aislado ambiental 3d.	34
2.2. Determinación más sensible de polimorfismo por amplificación de la región que concentra sitios polimorfos.....	38
2.3. Polimorfismo observado por secuenciación directa del producto del amplificado.....	40
2.4. Polimorfismo en el rRNA.....	43
3. Capitulo 3. Vibrios patógenos.....	44
3.1. Presencia de genes asociados a la patogenicidad de <i>Vibrio</i> spp en aislados de agua de mar	44
3.1.1. Caracterización de los aislados	44
3.1.2. Caracterización genética de la cepa C1.....	46
3.1.3. Caracterización fenotípica de la cepa C1.	50
3.2. Presencia de bacteriófagos asociados a vibrios patógenos.....	53
3.2.1. Aislamiento de fagos que infectan bacterias del género <i>Vibrio</i>	53

3.2.2. Rango de huésped de los fagos aislados.	54
3.2.3. Caracterización genética del Φ C1.....	55
3.2.4. Observación del Φ C1 por microscopía electrónica.....	57
3.2.5. Propiedades del <i>V. parahaemolyticus</i> C1.....	58
DISCUSIÓN	59
1. Polimorfismo en los genes repetidos del RNA ribosomal 16S.....	59
Detección y prevalencia del polimorfismo.....	59
Características del polimorfismo.....	62
Origen del polimorfismo.	63
Expresión de los genes polimorfos.....	65
Consecuencias del polimorfismo observado.	67
2. Vibrios patógenos en la costa chilena.....	68
Abundancia de Vibrios: Presencia de genes asociados a la patogenicidad de <i>Vibrio spp</i> en aislados de agua de mar.....	68
Caracterización del aislado de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> C1.....	69
Caracterización de ϕ C1.....	70
Variación de fase de <i>V. parahaemolyticus</i> C1.....	71
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	81

LISTA DE TABLAS

	PAGINA
Tabla I. Comparación de las diferencias en secuencia entre los amplificados del rDNA 16S de los clones de <i>V. parahaemolyticus</i> y del amplificado del rDNA 16S del fragmento de restricción F6.....	31
Tabla II. Comparación de las diferencias en secuencia entre los amplificados del rDNA 16S de los clones de la cepa de <i>Vibrio</i> sp 3d.	36
Tabla III. Diferencias en secuencias entre los amplificados del rDNA 16S comunicadas para <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 y <i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749 con las secuencias obtenidas de la cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD y la cepa C1.....	42
Tabla IV. Propiedades fenotípicas de la cepa C1.	51

LISTA DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Ensayo de movilidad del heteroduplete.....	16
FIGURA 2. Detección de polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S de <i>T. bispora</i> por el ensayo de migración del heteroduplete	22
FIGURA 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación por PCR del rDNA 16S de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i>	25
FIGURA 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra los heterodupletes formados en los productos de amplificación por PCR del rDNA 16S y en la hibridación entre amplificados de cepas tipo diferentes.	27
FIGURA 5. Southern blot y clonamiento de los diferentes rDNAs 16S de <i>V. parahaemolyticus</i>	28
FIGURA 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida del amplificado de la región espaciadora entre los genes del rDNA 16S y 23S de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC.....	29
FIGURA 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto amplificado por PCR del rDNA 16S obtenido de algunas cepas ambientales de vibrio y su relación con el amplificado del rDNA 16S de <i>V. parahaemolyticus</i>	33

FIGURA 8.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los amplificadores del rDNA 16S de los diferentes clones de la cepa de vibrio 3d y del producto obtenido después de la hibridación entre ellos.	35
FIGURA 9.	Ubicación de las regiones variables RVI y RVII de las cepas de vibrio, sobre el esquema de la estructura secundaria del rRNA 16S de <i>E. coli</i>	37
FIGURA 10.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos luego de la amplificación del fragmento de 180 pb del rDNAs 16S.....	38
FIGURA 11.	Perfiles obtenidos de la secuencia del fragmento de 180 pb del amplificado del rDNA 16S de <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210086 (Vpt) y de la cepa ambiental C1 (C1).....	40
FIGURA 12.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos después de la amplificación por RT-PCR del RNA de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802, cepa C1 de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> 17749 y <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210086.....	43
FIGURA 13.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes rRNA 16S y 23S del DNA extraído de los aislados de vibrio.....	45
FIGURA 14.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos	

	obtenidos de la amplificación por PCR del fragmento de 0.285 kb de <i>gyrB</i>	47
FIGURA 15.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos amplificados por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes rRNA 16S y 23S, del DNA extraído de <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802, de la cepa ambiental C1 y <i>V. alginolyticus</i>	49
FIGURA 16.	Gráfica de Arrhenius mostrando la dependencia de μ_{\max} (h^{-1}) versus la temperatura en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC (Vp), <i>V. parahaemolyticus</i> RIMD (Vpt), <i>V. alginolyticus</i> (Va) y la cepa C1.	52
FIGURA 17.	Efecto de la infección con Φ C1 sobre la curva de crecimiento de la cepa C1.....	53
FIGURA 18.	Efecto de la infección con Φ C1 sobre la curva de crecimiento de las cepas tipo de <i>V. alginolyticus</i> (Va) y de <i>V. parahaemolyticus</i> (Vp).....	54
FIGURA 19.	Microscopía electrónica de Φ C1.	57
FIGURA 20.	Visualización de los morfotipos de <i>V. parahaemolyticus</i> C1 en agar marino.....	58
FIGURA 21.	Esquema de posibles conformaciones de RV2, obtenidas con el programa MFOLD para la secuencia de los clones Vp27 y Vp44	61

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ITS	Región espaciadora 16S-23S del locus <i>rrn</i> (“Internal Transcribed Spacer”)
pb	Pares de bases
HMA	Ensayo de migración del Heteroduplete
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida

RESUMEN

El género *Vibrio* incluye un alto número de especies indígenas de agua de mar, algunas de las cuales pueden causar importantes enfermedades en humanos aún en ausencia de contaminación antropogénica (*V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*). Aunque la infección por estos vibrios se ha observado en Chile con baja frecuencia, el surgimiento de brotes es una amenaza constante a la salud humana y a la producción y explotación acuícola. En esta tesis se estudió el polimorfismo intra-cromosómico de los genes repetidos del rRNA 16S de bacterias del género *Vibrio*, y se exploró la presencia de genes relacionados con patogenicidad en aislados ambientales de estas bacterias.

En este proyecto el análisis de los rDNAs 16S obtenidos de una sola colonia de cepas tipo o cepas ambientales del género *Vibrio* reveló la presencia de polimorfismo en cada una de las cepas analizadas. El polimorfismo se detectó por la visualización de heterodupletes que se generan después de la amplificación por PCR del rDNA 16S, un procedimiento que permite examinar un gran número de aislados. El amplificado del rDNA 16S obtenido tanto de *V. parahaemolyticus* como de una cepa ambiental fueron clonados. Las secuencias nucleotídicas revelaron diferencias de hasta un 2% entre genes repetidos del rDNA 16S de una misma cepa. Los sitios polimorfos se encontraron concentrados en una región del gen rRNA 16S bacteriano que forma un lazo y una horquilla. En algunas cepas esta región concentraba hasta un 83% del total de sitios polimorfos. La acumulación de muchos cambios compensatorios en la región de lazo y horquilla implican que la divergencia de las diferentes versiones de este lazo y horquilla

es relativamente muy antigua. Esta divergencia podría ser el resultado de un proceso de selección o transferencia lateral de genes o regiones de genes que evolucionaron independientemente en otras bacterias.

El polimorfismo también se observó en el rRNA después de ser amplificado por RT-PCR, indicando que algunos de los genes diferentes eran expresados.

La exploración por genes relacionados con la patogenicidad de diferentes especies de *Vibrio* en aislados ambientales mostró sólo un gen relacionado con un aislado. Se exploró la presencia de *tdh*, *trh* y *gyrB* relacionados con la patogenicidad en *V. parahaemolyticus*; *vvhA* relacionado a *V. vulnificus*; y *ctxA*, *tcpA* y el espaciador de los genes rRNA 16 y 23S relacionados con *V. cholerae*. Este aislado, llamado C1, contiene el gen *gyrB*, relacionado al *V. parahaemolyticus*. La caracterización detallada mostró corresponder a un *V. parahaemolyticus*, pero con algunas características de *V. alginolyticus*. Este aislado no contiene todo el conjunto de genes considerados necesarios en una especie realmente patógena. Sin embargo, este aislado alberga un fago de amplio espectro de huésped que puede infectar tanto *V. alginolyticus* como *V. parahaemolyticus*. Aunque es posible aislar bacterias con genes asociados a vibrios patógenos en las aguas costeras chilenas, éstas no parecen ser cepas realmente virulentas.

SUMMARY

The genus *Vibrio* includes a number of bacterial species that in spite of being indigenous of the sea (*V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*) with the exception of *V. cholerae*, which is terrestrial, may infect humans with serious consequences.

In this work we explore the commonness polymorphism and the extent of sequence dissimilarity among repeated 16S rRNA genes, in type strains of genus *Vibrio* and environmental isolates. Analysis of the 16S rDNAs obtained from cultures of single colonies of either type collection strains or environmental strains of the genus *Vibrio* revealed the presence of polymorphism in almost every one of the strains examined. Polymorphism was detected by visualization of heteroduplexes produced after 16S rDNA PCR amplification, a procedure that allows for the screening of a large number of isolates. Amplified 16S rDNAs obtained from both *V. parahaemolyticus* and an environmental strain were cloned. Their nucleotide sequences revealed differences of up to 2% among 16S rDNAs from the same strain. Polymorphic sites were concentrated in a recognized variable stem loop of bacterial 16S rRNA that contained in some cases up to 83% of the total mismatches observed. Most of the substitutions present in the stem loop region showed compensating base covariation. The accumulation of so many compensating changes in the stem loop region implies that the divergence of the different versions of this stem loop is relatively ancient. This divergence could be the result of either a selection process or a lateral transference of independently evolved genes.

Polymorphism was also observable in the rRNA when this was amplified by RT-PCR, indicating the expression of at least some of the different genes.

In this work we also explored the presence of putative pathogenic vibrio strains, carrying amplicons related to pathogenic species of this genus, isolated in coastal waters of the Southern Pacific Ocean (Chile). A search for bacteria of this genus containing genes related with virulence was conducted and isolates of the genus *Vibrio* were grouped according to the size pattern of their 16-23S rDNA spacer regions. One isolate from each of 20 different groups was then tested by PCR amplification for the presence of the following genes, related with pathogenicity: *tdh*, *trh*, and the *girB* related to pathogenic *V. parahaemolyticus*; *vvhA* related to *V. vulnificus*; and *ctxA*, *tcpA* and the 16-23S rDNA spacer region related to *V. cholerae*. Only a single *Vibrio* isolate carrying a pathogenicity associated gene was detected. Further characterization of this isolate suggested, however, that it lacked additional properties to be virulent. The results indicated that this strain belong to the species *V. parahaemolyticus* but contains many properties more closely related to *V. alginolyticus*. This strain can host a phage present in the Chilean coastal waters.

INTRODUCCIÓN

1. Diversidad o polimorfismo de los genes del rRNA 16S:

El gen rRNA 16S ha sido uno de los más útiles para establecer relaciones filogenéticas y permite la identificación de género y de ciertas especies bacterianas. Se ha utilizado también para distinguir y caracterizar poblaciones específicas de comunidades microbianas (Amann y col., 1995; Gray y col., 1984). Los estudios se han basado en un consenso general que en microorganismos que contienen más de un operón de genes ribosomales, los genes rRNA 16S son idénticos o cercanamente idénticos. Esta suposición es válida para algunas especies bacterianas pero no para todas. Por ejemplo, entre cepas bacterianas para las cuales está disponible la secuencia completa del genoma hay algunas cepas con múltiples operones ribosomales que no presentan diferencias en las secuencias nucleotídicas de sus rDNAs 16S. Es el caso de *Treponema pallidum*, *Xylella fastidiosa*, *Synechocystis* PCC6803, que poseen 2 operones ribosomales; *Campylobacter jejuni* con 3, *Neisseria meningitidis* con 4 y *Haemophilus influenzae* con 6 operones. En cambio, otras presentan polimorfismo en este gen como *Helicobacter pylori* y *Ureaplasma urealyticum*, que poseen 2 operones ribosomales, *Escherichia coli* con 7, *Vibrio cholerae* con 8 y *Bacillus subtilis* con 10 operones. Estos genomas presentan diferencias entre las copias de sus rDNAs 16S en un rango de 0.6 a un 2% (www.ncbi.nlm.nih.gov y www.tigr.org). El polimorfismo ha sido previamente sugerido por la observación de variaciones nucleotídicas en un rango de 1 - 5% entre pares de secuencias de los genes del rRNA 16S de una cepa bacteriana o de diferentes cepas de la misma especie depositadas en bancos de datos (Clayton y col., 1995). Las secuencias del

rDNA 16S de las cepas bacterianas depositadas son usualmente obtenidas de un sólo clon de un operón o del total del rDNA 16S o del 16S rRNA. Del clonamiento de un operón resulta una secuencia propia del operón clonado que puede ser diferente a la de los otros operones. La secuenciación directa de productos de PCR o de RT-PCR en cambio, produce resultados en los cuales la presencia de más de un nucleótido en el mismo sitio puede no distinguirse o no considerarse. El polimorfismo del rDNA 16S ha sido previamente observado en *E. coli* en la cepa PK3 (Cilia y col., 1996), *Paenibacillus polymyxa* (Nubel y col., 1996), *Mycobacterium celatum* (Reischl y col., 1998), *Thermobispora bispora* (Wang y col., 1997), cepas de *Streptomyces* (Ueda y col., 1999) y en *Thermomonospora chromogena* (Yap y col., 1999). Recientemente, Dahllöf y col., (2000) mostraron polimorfismo intraespecie del rDNA 16S en diferentes aislados bacterianos, utilizando electroforesis en geles desnaturantes (DGGE). Este polimorfismo no fue observado para el gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*), el cual parece estar en una sola copia en estos aislados. Aunque estos datos prueban la existencia de operones con genes rRNA 16S diferentes en el mismo organismo, la abundancia o frecuencia en diferentes especies, el mecanismo que lo genera, su posible función y por qué se observa en algunas especies y no en otras es materia no resuelta.

El origen de distintos tipos de genes de rRNA en un organismo ha sido atribuido a la evolución divergente luego de duplicación de estos genes o a la transferencia horizontal de genes similares desde otras cepas relacionadas (Mylvaganam y col., 1992, Wang y col., 1997). La transferencia horizontal parece ser más probable de acuerdo a las últimas evidencias (Droge y col., 1998). Uno de los principales impedimentos argüido contra la transferencia horizontal era que la coevolución del rRNA con los numerosos

componentes de la maquinaria traduccional con los que debe interactuar impedían el funcionamiento de un gen rRNA 16S diferente que pudiera ser transferido desde otra especie. Sin embargo, Asai y col., (1999) utilizando *E. coli* (a la cual se le habían eliminado todos sus operones ribosomales pero que podía mantenerse viable por un operón en un plasmidio) demostraron que este operón podía provenir de *Salmonella typhimurium* o de *Proteus vulgaris*. Yap y col. (1999) también encontraron evidencias de transferencia horizontal de un operón ribosomal en *T. chromogena*.

2. Bacterias del género *Vibrio*

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos cortos, Gram negativos y aeróbicos facultativos, que poseen un metabolismo fermentativo (Doyle y col., 1997). Están presentes en abundancia en todos los mares donde se han examinado (Sechi y col., 2000). Existen numerosas especies indígenas de agua de mar, algunas de las cuales pueden causar importantes enfermedades en humanos. Entre las especies de *Vibrio* patógenas más frecuentes se encuentran *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, las cuales producen enfermedad con gran variación en su severidad.

El género incluye un alto número de especies bacterianas que se encuentran muy relacionadas de acuerdo a sus rDNAs 16S, que difiere desde menos de un 1% hasta 6% en sus secuencias nucleotídicas (Dorsch y col., 1992; Ruimy y col., 1994). Muchas de las especies del género *Vibrio* comparten un mismo hábitat (agua de mar) en el que pueden intercambiar genes, por contacto físico directo o indirecto a través de bacteriófagos presentes en grandes cantidades (Jiang y Paul, 1998; Waldor y Mekalanos, 1996, Mazel y col., 1998). Dentro del género es característico que muchas especies

presenten varios cromosomas (Yamaichi y col., 1999). También es frecuente la presencia de varios operones ribosomales. Por ejemplo *V. parahaemolyticus*, *V. fischeri* y *V. harveyi* contienen entre 8 a 11 operones (Maeda y col., 2000, Lamfrom y col., 1978; Wolfe y Haywood, 1993; Fegatella y col., 1998). Como ya se había mencionado, la secuencia del genoma completo de *V. cholerae* (Heidelberg y col., 2000) muestra que sus 8 operones contienen genes rDNA 16S que pueden diferir hasta en 1%. Es posible que la presencia de varios operones aumente la probabilidad de encontrar polimorfismo dentro de este género.

Los estudios en bacterias del género *Vibrio* podrían dilucidar si éste es un fenómeno frecuente dentro de estas bacterias y que características presenta.

3. Principales Vibrios patógenos

En este género *V. cholerae* es el patógeno mejor estudiado. Es una bacteria no invasiva, causante del cólera tanto en forma epidémica como endémica alrededor del mundo (Colwell, 1996, Mooi y Bik, 1997). Se trasmite casi exclusivamente a través del agua y no suele infectar otros hospederos. *V. cholerae* crece en agua salada pero a diferencia de otros vibrios marinos, no es un halófilo obligado y puede también reproducirse en ambientes de agua fresca. Los alimentos del mar son un importante vehículo del cólera. En Chile, el Instituto de Salud Pública (ISP) ha confirmado 177 infecciones por *V. cholerae* entre 1991-1999. La mayoría de los casos ocurrieron en la I y II región durante los años de las epidemias mundiales. Otros vibrios patógenos predominantes en hábitat marinos y frecuentes en estuarios son *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Son halófilos asociados a infecciones por consumo de alimentos marinos o actividades relacionadas

con su producción o extracción. (Oliver, 1989; Shapiro y col., 1998; DePaola y col., 1998). *V. parahaemolyticus* es un patógeno relacionado con gastroenteritis y diarrea del viajero. Es la principal causa de gastroenteritis en Japón por el consumo de pescado y mariscos crudos pero también ocurre en otras partes del mundo, incluyendo Estados Unidos (Doyle, 1997). En Chile según el ISP se han confirmado 399 casos en los últimos 10 años, la gran mayoría en la primera y segunda regiones, aunque en este caso el número es también alto en la III y IV región. *V. vulnificus* además de producir gastroenteritis que en algunos casos deriva en septicemias es capaz de infectar humanos directamente a través de heridas. Las infecciones por heridas asociadas al contacto con agua de mar o por ingestión tienen un 20 a un 25 % de fatalidad en individuos con deficiencia inmune o problemas cirróticos. Las infecciones en la piel requieren generalmente debridamiento del tejido afectado o amputación. Los estudios epidemiológicos indican que un número extremadamente bajo de este patógeno puede ser suficiente para iniciar infecciones fatales en personas comprometidas inmunológicamente (Linkous. y Oliver, 1999). En Chile no se han comunicado casos de infección por *V. vulnificus* en los últimos 10 años (ISP).

El riesgo de intoxicación por vibrios a través de mariscos contaminados es altamente dependiente de la concentración de estas bacterias en agua de mar. La concentración de especies de *Vibrio* en agua de mar muestra una gran variación estacional, probablemente relacionada a la temperatura del agua. Puede no detectarse (menos de uno por ml) en agua costera del océano Atlántico norte durante el invierno, cuando la temperatura del agua de mar es menor de 6 °C, pero puede alcanzar concentraciones mayores de un millón por ml durante el verano, cuando la temperatura es de 20 °C o más (Kaspar, 1993;

Motes y col., 1998; Kaneko y Colwell, 1973). Muchos de los estudios sobre especies de *Vibrio* han sido hechos en zonas templadas del océano Atlántico con grandes variaciones estacionales de temperatura, o en la costa del golfo, donde la temperatura del agua es particularmente alta durante todo el año.

4. Mecanismos de patogenicidad:

En *V. cholerae*, se han descrito cepas patógenas como no patógenas. En esta especie existe una variedad de cepas y biotipos con propiedades para recibir y transferir genes para toxinas, factores de colonización, resistencia a antibióticos, polisacárido capsular y antígenos de superficie, como el lipopolisacárido 0139 o el antígeno capsular O. Uno de los mecanismos de patogenicidad más conocidos es el descrito para *V. cholerae* 01 y 0139 (Nishibuchi y Kaper, 1995). La diarrea producida por *V. cholerae* es atribuida a la toxina colérica (CT). La CT es codificada por el operón *ctx* y su expresión está regulada por genes de virulencia tales como *toxT*, *toxR* y *toxS* (Chakraborty y col., 2000; Kovacicova y Skorupski, 2000; Provenzano y col., 2000). El gen *ctx* y otros genes involucrados en virulencia pueden ser transferidos entre cepas por transducción (Boyd y col 2000). Se ha descrito que el operón *ctxAB* forma parte del genoma del fago CTX ϕ , junto con otros factores de virulencia como la toxina ZOT (Zonula occludens toxin), la enterotoxina accesoria (Ace) y la pilina (*cep*) (Faruque y col., 1998). Evidencias obtenidas recientemente indican que otro bacteriófago de *V. cholerae*, VPI ϕ , codifica para un pili que funciona como el factor de colonización del intestino y que es además el receptor para CTX ϕ (Karaolis y col., 1999; Waldor y Mekalanos, 1996).

Las cepas de *V. vulnificus* son conocidas por la alta variación en su virulencia. *V. vulnificus* es un patógeno oportunista que puede causar septicemias y produce varios productos implicados en virulencia incluyendo una citolisinas/hemolisina, un polisacárido capsular y otros productos extracelulares (Oliver y col., 1986, Amaro y col., 1994, Linkous y Oliver, 1999).

Los aislados patógenos de *V. parahemolyticus* se distinguen por producir una hemolisina y algunos otras enzimas que están involucradas en el establecimiento de la infección intestinal y la producción de diarrea. La capacidad de hemólisis, designada como fenómeno de Kanagawa (KP), es considerada como el principal marcador de virulencia y se debe a la presencia de una hemolisina llamada hemolisina termoestable directa (TDH) (Nishibuchi y Kaper, 1995). También se ha descrito una hemolisina en aislados clínicos KP negativos, denominada hemolisina TDH relacionada (TRH), la cual es similar a la TDH en sus características fisicoquímicas, inmunológicas y biológicas. El poseer el gen *trh* está asociado con un fenotipo ureasa-positivo (Lida y col., 1998; Park y col., 2000). Esta relación ha permitido utilizar la producción de ureasa como un marcador de virulencia para el diagnóstico clínico de *V. parahaemolyticus* (*trh*-positivo) (Park y col., 2000). Las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de diarrea de pacientes producen la hemolisina termoestable directa (TDH) o la hemolisina relacionada (TRH) o ambas, propiedades sólo encontradas en una minoría de la población de las cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* (Lida y col., 1998). Existen observaciones que sugieren que algunos patógenos de *V. parahemolyticus* adquirieron el gen *tdh* y posiblemente el gen *trh*, por transferencia genética horizontal (Yamaichi y col., 1999).

Como parte de esta tesis se exploró la presencia de bacteriófagos para vibrios en agua de mar .

5. Ecología de los vibrios marinos

Los estuarios representan reservorios críticos de especies del género *Vibrio* potencialmente patógenas que pueden contaminar aguas y productos del mar en total ausencia de contaminación antropogénica.

La presencia de vibrios potencialmente patógenos constituye un riesgo a la salud difícil de evaluar, debido a la carencia de métodos que identifiquen inequívocamente organismos patógenos como *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. El nivel del conocimiento actual sugiere que existe un reservorio de genes en los estuarios, que pueden combinarse con una frecuencia quizás mucho mayor a la previamente estimada. Por esto su monitoreo es muy importante aún en aguas no contaminadas (Heidelberg J. y col., 2000; Faruque y col., 1995). Este monitoreo debe considerar la presencia no solamente de bacterias si no también la presencia de genes asociados con patogenicidad que pueden, al ser incorporados en un “background” apropiado, generar especies patógenas virulentas (Nishibuchi y col., 1996, Boyd y col., 2000, DePaola y col., 1998, Kaspar, 1993).

Diferentes estudios han intentado estimar la cantidad de vibrios patógenos midiendo algunas propiedades fenéticas asociadas con patogenicidad. En esta forma Barbieri y col., (1999) mostraron la presencia de cepas de vibrio potencialmente patógenas a lo largo de la costa del Adriático al detectar cepas productoras de citotoxinas. Sechi y col., (2000) realizando estudios genéticos encontraron que varias cepas de *V. alginolyticus*

(no patógenos) podrían contener genes de *toxR*, *toxT*, *tcpA*, o *ace*, relacionados con patogenicidad en *V. cholerae*. Baffone y col., (2000) y Deriu y col., (2002) en estudios independientes también encontraron algunos factores de citotoxicidad y genes de virulencia de *V. cholerae* en diferentes especies de *Vibrios* halófilos, aislados desde mariscos.

Recientemente se han desarrollado varios procedimientos para el diagnóstico de *Vibrio* patógenos basados en la detección de genes codificantes para factores asociados con virulencia. Existen por ejemplo ensayos de PCR específicos para detectar la presencia de genes como *tdh* y *trh*, que codifican para las hemolisinas termoestable y termoestable relacionada producidas por *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran y col., 1998), *vhA*, que codifica para una citoxina hemolisina producida por *V. vulnificus* (Lee y col., 1999), *ctxA* (Field y col., 1992) y *tcpA* (Keasler y Hall, 1993) asociados con virulencia de *V. cholerae*. El gen *gyrB* específico de *V. parahaemolyticus* (Kim y col., 1999, Venkateswaran y col., 1998). Existe también un PCR específico para la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rDNA (ITS) de *V. cholerae* (Chun y col., 1999).

Como parte de esta tesis se exploró la presencia de estos genes asociados a vibrios patógenos en bacterias aisladas de la costa chilena.

La ecología y las propiedades observadas de los vibrios sugieren que en especies de este género la transferencia horizontal de genes puede ser frecuente, incluidos aún los genes de RNA ribosomales. La transferencia horizontal puede dar origen al polimorfismo en rRNA 16S observado frecuentemente en especies de este género y que genes considerados propios de especies patógenas se encuentren en otras especies del mismo género o familia. Por esta razón, se formularon las siguientes hipótesis:

El polimorfismo en secuencia de los rDNAs 16S intra cromosómico observado en algunas especies es una propiedad común en cepas tipos y en aislados ambientales del género *Vibrio*.

Genes evolutivamente muy cercanos pueden estar presentes en especies con mayor distancia evolutiva de acuerdo a sus rRNAs 16S o al grado de homología del genoma total.

Las bacterias con genes potencialmente transferidos en forma horizontal pueden ser hospederos de fagos capaces de transducir estos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de cultivo. Las siguientes cepas bacterianas fueron utilizadas en la realización de esta tesis: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802T, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *Thermobispora bispora* ATCC 19993. *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 donada por el Dr. Honda del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Microbianas, Universidad de Osaka del Japón. *V. cholerae* (ISP NO 01) obtenida del Instituto de Salud Pública de Chile. Las condiciones de cultivo fueron las indicadas por las respectivas colecciones.

2. Aislados ambientales. Las cepas ambientales se obtuvieron desde agua de mar. Las muestras se colectaron en dos puntos a lo largo de la costa chilena, Coloso y Horcón en las latitudes 23 S y 32 S, respectivamente. El número de bacterias cultivables se estimó por siembra en agar marino como lo describe Collins y col., (1991). El número total de bacterias se estimó por microscopía de epifluorescencia por tinción con DAPI (concentración final de 5 µg/ml) y naranja de acridina (AO) (concentración final 1 mg/ml) como previamente lo describe Kuwae y Hosokawa (1999). Para los aislados de agua de mar, las muestras se filtraron a través de papel de filtro Whatman no.1 y las bacterias fueron posteriormente colectadas en una membrana con un tamaño de poro de 0.4 µm (Millipore). Las bacterias colectadas en la membrana se resuspendieron por agitación por vórtex en 2 ml de agua peptonada alcalina (APW) y posteriormente

sembradas sobre un medio de agar de tiosulfato citrato-bilis sucrosa (TCBS) suplementado con 2% NaCl. Las bacterias resuspendidas se sembraron directamente o después de una incubación en el medio de APW para enriquecimiento según el método descrito por Kaper y col., (1995).

Las placas de TCBS se incubaron a 37°C o 17°C por 16 a 18h. Las colonias aisladas se replicaron en agar marino y después de dos o tres repliques sucesivos, las colonias fueron caracterizadas.

3. Análisis por Southern blot. El DNA de *V. parahaemolyticus* fue purificado como previamente lo describe (Sambrock y col., 1989). 3.5 µg del DNA fueron digeridos con 9 unidades de la enzima *EcoRI* (Gibco BRL). El producto de digestión se separó por electroforesis en un gel de agarosa (1.5%) y el DNA se transfirió a una membrana Hybond N+. Para la hibridación se utilizó una sonda de DNA de 1.4 kb específica para el rDNA 16S generada por amplificación por PCR del DNA extraído de *V. parahaemolyticus* y marcado por random primer con digoxigenina 11-dUTP. Para este objeto se utilizó un kit para marcación de DNA DIG (Boehringer Mannheim) en la forma recomendada en las instrucciones del proveedor. La hibridación y detección inmunológica de la sonda marcada-DIG se realizó usando el kit de detección DIG-luminiscent de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim). La hibridación y los lavados se realizaron usando el buffer de hibridación estándar a una temperatura de 68 °C.

El DNA de *T. bispora* se purificó y trató en iguales condiciones que *V. parahaemolyticus* pero fue digerido con la enzima *XhoI* según lo indica Wang y col., (1997).

4. Elución del DNA de geles de agarosa. Una sección longitudinal del gel utilizado para el Southern Blot, conteniendo el DNA de *V. parahaemolyticus* digerido, se cortó en segmentos correspondientes a las bandas observadas en el Southern blot. El DNA se eluyó centrifugando los fragmentos sobre lana de vidrio estéril durante 30 seg. a 10,000 x g. El DNA eluído fue luego amplificado directamente sin purificación adicional, salvo una dilución de al menos 100 veces en TE (Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0).

El DNA plasmidial se separó del DNA genómico mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para luego ser eluído al pasar los fragmentos a través de lana de vidrio igual que en el caso anterior.

5. Extracción de DNA. El DNA para PCR se obtuvo desde colonias aisladas de placas de agar marino resuspendidas en 50 µl de TE. La lisis se llevó a cabo hirviendo la suspensión durante 15 min. El lisado fue posteriormente centrifugado a 5,000 x g por 15 seg. y 1,5 µl del sobrenadante se usó directamente para la amplificación.

6. Amplificación por PCR. El DNA se mezcló con igual volumen de mezcla de reacción para obtener una concentración final de MgCl₂ 2.0 mM, nucleótidos 0.2 mM de cada uno, Taq polimerasa 0,05 U/µl. La mezcla contenía además los partidores

adecuados a una concentración de 0,25 μ M. Estas condiciones fueron usadas para la amplificación del gen rRNA 16S entre las posiciones 28 a 1492 (números en *E.coli*) con los partidores 27F y 1492R y la amplificación de la región de 357 a 518 con los partidores descritos por Lane, (1991), y para las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S, amplificadas con los partidores G1 y L1 (Pizarro y col., 1996). Las condiciones y el programa de amplificación fue descrito por Espejo y col., (1998).

La amplificación de los genes asociados a la patogenicidad de algunas bacterias del género *Vibrio* se realizó usando los procedimientos ya descritos para cada uno: para el gen *vvhA* de 222 pb (Lee y col., 1999), *ctxA* de 563 pb (Field y col., 1992), *tcpA* de 617 pb y *tcpAET1* de 471 pb (Keasler y col., 1993), *tdh* de 382 bp (El Tor biotype) y *trh* de 460 pb por (Suthienkul y col., 1995), *gyrB* de 285 pb (Venkateswaran y col., 1998), regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S rDNA de *V. cholerae* (ISR Vc), 315-310 pb (Chun J y col., 1999) y *gyrB* de 1200 bp (Venkateswaran y col., 1998).

Luego de la amplificación, se agregaron 5 μ l de una solución de azul de bromofenol al 0.025% en glicerol al 50% en TE pH 7,5. 5 μ l de esta mezcla fue posteriormente utilizada para la electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Espejo y col., 1998).

7. Análisis de restricción. El producto de amplificación del gen *gyrB* (285 pb) se digirió con 1,5 U de endonucleasa de restricción *CfoI* y *EcoRI* en reacciones separadas, como lo indican los fabricantes (Gibco BRL). La digestión se realizó por 1 h a 37°C y los

fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (Espejo y col., 1998).

8. Homología del DNA por rapidez de renaturación. La extracción de DNA se realizó a partir de 400 ml de cultivo en fase exponencial como previamente lo describió Doore, (1992). El DNA purificado se dializó contra un buffer citrato salino (SSC; NaCl 0,15M, citrato di-Na 0,015 M, pH 7.0). La velocidad de renaturación se determinó como lo describe De Ley y col., (1970) con DNA fragmentado a tamaños menores de 20 Kb. La fragmentación se logró pasando la solución de DNA repetidas veces a través de una aguja de jeringa de tuberculina. El tamaño de los fragmentos se estimó en un gel de agarosa al 1%. La concentración del DNA fue luego ajustada a una absorbancia a 260 nm de 2.0 y se determinó la rapidez de renaturación de las diferentes combinaciones por la disminución en la absorbancia después de desnaturalización como lo describe Huss y col., (1983). Se utilizó un espectrofotómetro Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System. La absorbancia fue medida a 72 °C y a una longitud de onda de 260 nm cada 15 sec durante 40 min. La velocidad de renaturación se determinó por la disminución de la absorbancia (v) y el grado de unión (%D) (similitud) se calculó de acuerdo a la fórmula $\%D = 100X (4v_M - v_A - v_B) / 2 (v_A \times v_B)$ De Ley y col., (1970).

9. Análisis de heterodupletes, clonamiento y secuenciación del amplificado del rDNA 16S. El ensayo de movilidad de los heterodupletes se realizó como lo describe Espejo y col., (1998). La electroforesis se realizó a 150 V (Figura 1).

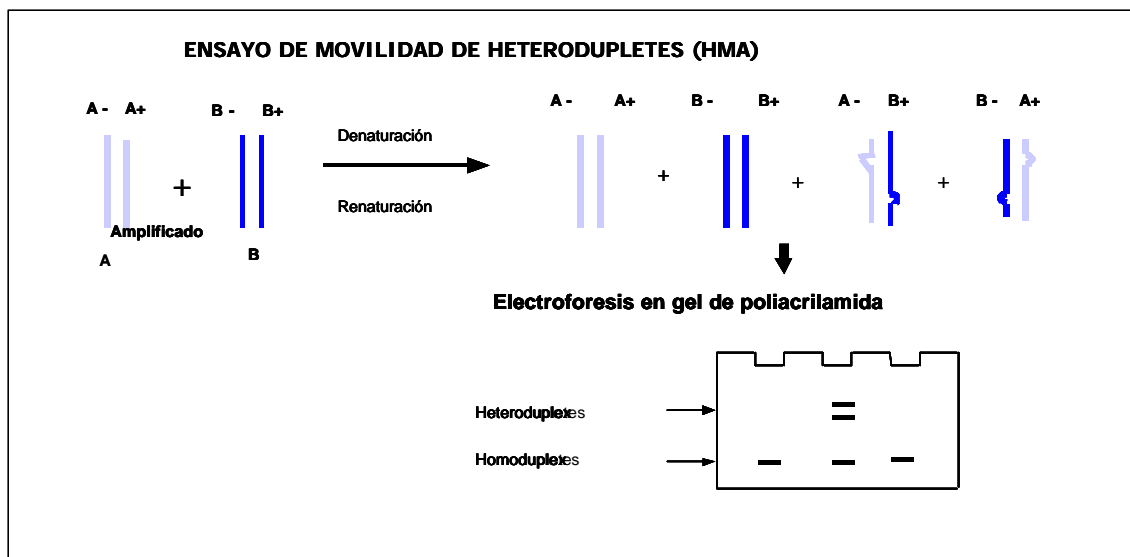


Figura 1. Ensayo de movilidad del heteroduplete (Espejo y col., 1998)

El producto del PCR fue clonado en el vector TOPO TA de acuerdo al procedimiento indicado por Invitrogene. El plasmidio fue obtenido por extracción alcalina (Birnboim, 1983). Para eliminar el DNA genómico se separó el DNA plasmidial por electroforesis en agarosa y la banda correspondiente se extrajo por el método de lana de vidrio, en la forma ya descrita (método 4). El DNA eluído se diluyó (1/10 vol/vol) en agua destilada estéril y se usaron 15 μ l para la amplificación del rDNA 16S como se ha descrito previamente (método 6). En algunos casos los plasmidios se diluyeron (1:500 vol/vol) en agua destilada estéril y se usaron 15 μ l para la amplificación del rDNA 16S.

Para la secuenciación, los plasmidios fueron purificados con un sistema rápido de purificación (Wizard Plus SV Minipreps, Promega). La secuenciación se hizo utilizando nucleótidos fluorescentes en un secuenciador automático Applied Biosystems 310. Se utilizaron partidores universales para M13 u otros que alinean con secuencias internas

conservadas del rRNA 16S. Estos partidores fueron Eubac27F, 357F, 946F, 1492R, 1100R y 518R (Lane., 1991)

10. Análisis de secuencia. Las secuencias de DNA se inspeccionaron individualmente y ensamblaron manualmente. El alineamiento y similitud de las secuencias se realizó con Clustal W, programas del EMBL Outstation - European Bioinformatics Institute (EBI) y BLAST. La similitud de las secuencias en sitios específicos se calculó manualmente. El análisis de la estructura secundaria fue llevado a cabo con el programa MFOLD (Genetics computer Group, Inc., Madison, Wis).

11. Preparación del RNA. Para el aislamiento de RNA total, se colectaron las células de un cultivo en fase exponencial a una absorbancia de 0.4 a 600 nm y se trataron con el reactivo TRIZOL de acuerdo a lo indicado por el fabricante (GIBCO BRL). El DNA se removió por tratamiento con DNAsa I libre de RNAsa (Boehringer Mannheim) como previamente lo ha descrito Huang y col., (1996).

12. RT Transcripción reversa. Para la transcripción reversa, se utilizó el oligonucleótido 357F para la síntesis del cDNA. Un microgramo del RNA total se usó como templado y la transcripción reversa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (AMV RT de Promega). Dos microlitros de la mezcla de reacción de la transcriptasa reversa se usaron directamente como templados en 30 μ l de mezcla para PCR. Esta contenía 0,25 μ M de cada uno de los partidores, 0.2 mM de cada dNTP, 0,5

U/μl de DNA polimerasa Taq y buffer GIBCO BRL. El programa de PCR fue el descrito por Espejo y col., (1998).

13. Electroforesis y tinción de ácidos nucleicos. Después de la amplificación del DNA, los productos se sometieron a electroforesis en un gel de 10 cm de longitud con poliacrilamida al 7% en buffer Tris Borato-EDTA (89 mM Tris-HCl pH 8.3, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA) y el DNA se visualizó con nitrato de plata según las condiciones descritas por Espejo y col., (1998).

El RNA se visualizó utilizando geles de agarosa al 1% en buffer Tris borato-EDTA (TBE) teñidos con bromuro de etidio al 1%.

14. Caracterización bioquímica. Los ensayos bioquímicos se realizaron como lo describe Collins y Lyne (1989). Estos incluyen crecimiento en medio TCBS, fermentación de azúcar, actividad enzimática (hidrólisis de urea, oxidasa), tolerancia a sales, producción de gas desde D-glucosa, movilidad, swarming en agar marino 25°C y sensibilidad a un agente vibriostático O/129 (150 μg). La hemólisis sobre agar sangre se probó como se describe en el manual de la FDA (Manual de Análisis Bacteriológico) [<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mi.html>]. La velocidad de crecimiento a diferentes temperaturas se midió por el aumento en absorbancia a 600 nm al incubar en medio marino. Las temperaturas utilizadas fueron: 46, 40, 37, 32, 27, 24, 22, 19, 17, 14 y 12 °C. La expresión de la dependencia del crecimiento bacteriano versus la temperatura fueron

evaluada en términos de la energía libre, calculando el ΔG por la ecuación de Arrhenius (Koutsoumanis y col., 2000).

15. Aislamiento de fagos y ensayo de actividad lítica. Muestras de agua marina se filtraron con filtros estériles de 0.22 μM para eliminar las bacterias. Para aumentar la cantidad de se incubaron 5 ml del filtrado con 100 μl de cultivo en fase exponencial de cada una de las cepas huéspedes potenciales. La incubación se realizó por 48 h a 30°C con agitación. Tres ml del cultivo enriquecido se trataron luego con cloroformo al 0.1% se centrifugaron a 10,000 x g por 5 min. El sobrenadante se examinó para detectar la presencia de fagos mediante el método de doble agar (Ichige y col., 1989).

16. Multiplicación por infección en medio líquido y obtención de lisados. 200 μl de un cultivo de la noche de la cepa a infectar se inoculó en 50 ml de caldo marino (MB). El cultivo se incubó a 30°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm cercana a 0.1. En ese instante el cultivo se dividió en dos; uno de ellos se infectó con 100-2500 μl de una suspensión de fagos y el otro se mantuvo como control. Los cultivos se incubaron con agitación haciendo medidas periódicas de la densidad óptica cada 15 a 20 min. Para la obtención del lisado, se colectaron fracciones del cultivo y se trataron con cloroformo al 0.1% final durante 30 min. a 30°C y con agitación. Posteriormente se centrifugó a 5,100 x g por 10 min. a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se almacenó con cloroformo al 0.3%

17. Extracción de formas replicativas. Las células se colectaron centrifugando 1.5 ml del cultivo a 5,100 x g por 60 s a temperatura ambiente. La obtención de formas replicativas se llevó a cabo siguiendo el método de lisis alcalina de Birnboim (1983).

18. Ensayos de inducción del profago.

- a) La inducción del profago por modificación en la concentración de sal, pH y tratamiento a luz visible se realizó según lo descrito por Faruque y col., (2000).
- b) La inducción por tratamiento con Mitomicina C (0.5 µg/ml) fue descrito por Williamson y col., (2001).
- c) La inducción en un medio con MgCl₂ y la actividad lítica según lo descrito por Nasu y col., (2000).

19. Observación directa del fago por microscopía electrónica. Un ml de los sobrenadantes colectados de cultivos control e infectados se ultracentrifugaron a 100,000 g por 1h a 4°C y las partículas sedimentadas se resuspendieron en 25 µl de agua destilada. Estas muestras se tiñeron con 1% (p/v) de acetato de uranilo (tinción negativa) y posteriormente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM 100. El análisis del fago por microscopía se realizó sobre grillas con membrana formvar cubiertas con carbón.

RESULTADOS

Capítulo 1.

1. Detección de polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S de *Termonobispora bispora* por el ensayo de migración del heteroduplete.

Inicialmente y para comprobar la aplicabilidad del método a utilizar para la detección de polimorfismo, se realizaron ensayos preliminares con una cepa cuyo polimorfismo en los genes repetidos de rDNA 16S era conocido. Se seleccionó la cepa de colección *Termonobispora bispora* que posee cuatro operones de rRNA con una diferencia intra operones de 6.4% en la secuencia de sus rRNA 16S (Wang, y col., 1997).

De acuerdo a lo discutido en los métodos, el gen rDNA 16S fue amplificado utilizando DNA total de *T. bispora* y el producto se separó por electroforesis en gel de poliacrilamida. De acuerdo a lo esperado, se pudo observar una banda de menor migración que el homoduplete, correspondiente al heteroduplete. (Figura 2b, carril Tb) De acuerdo a la migración relativa del heteroduplete (Espejo y col.,1998), el porcentaje de disimilitud pudo ser estimado en un 6% y correspondió a lo descrito por los autores de la observación original (Wang y col., 1997).

Para caracterizar los rDNA 16S en diferentes operones, el DNA total se trató con la enzima de restricción *EcoRI*. Posteriormente, se obtuvo diferentes fragmentos de restricción conteniendo el rDNA 16S de acuerdo a un gel paralelo de Southern blot (Figura 2a) y cada fracción fue luego amplificada para rDNA 16S. Los productos de cada amplificación se hibridaron entre sí para determinar el grado de homología de

acuerdo al retardo de la migración electroforética del híbrido (Figura 2b). En la hibridación se observó la formación de heterodupletes entre aquellos amplificados de los operones reportados diferentes en su rDNA 16S. Por ejemplo, los operones A y B que contienen diferentes secuencias en sus rDNAs 16S según lo reportado Wang y col. (1997) formaron un heteroduplete con migración similar a la observada en el amplificado del genoma de *T. bispora*.

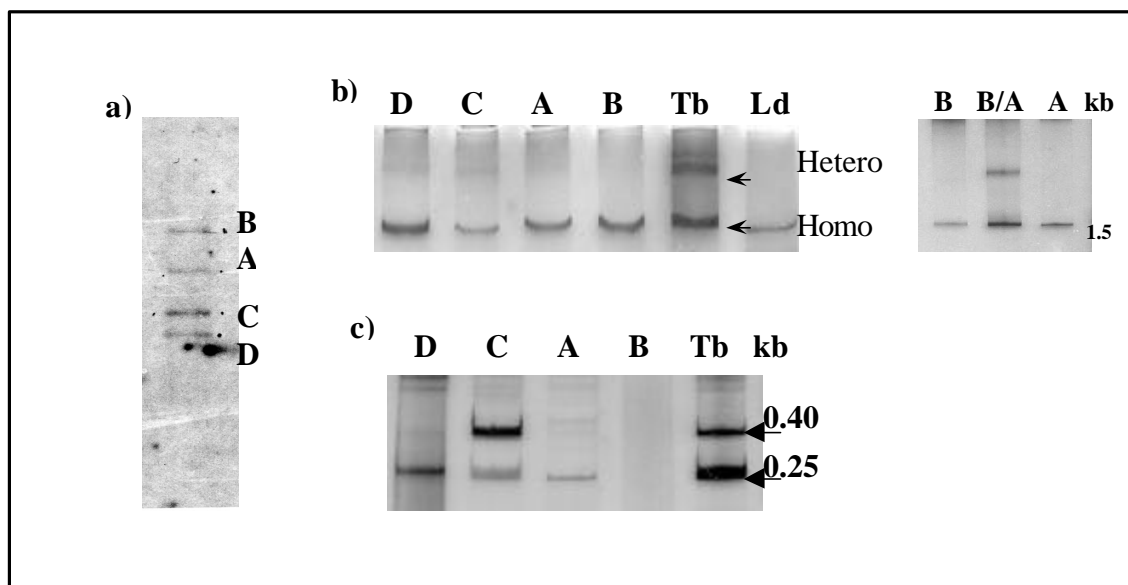


Figura 2. Detección de polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S de *T. bispora* por el ensayo de migración del heteroduplete. a) Southern blot del DNA de *T. bispora*. El DNA digerido con la enzima *XhoI* fue hibridado con una sonda específica para el rDNA 16S. b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) del amplificado del rDNA 16S para cada uno de los fragmentos eluidos de un gel paralelo al southern blot (carriles A, B, C y D corresponden a los respectivos operones, carril A/B hibridación entre los amplificados A y B). Carril Tb amplificado del rDNA 16S del DNA total de *T. bispora*. Ld corresponde al marcador de peso molecular mostrando la banda correspondiente a 1.5kb. c) PAGE del amplificado de la región espaciadora entre los genes del 16S y 23S rDNA para los mismos fragmentos eluidos.

Con el objeto de reconocer los espaciadores entre los genes 16S y 23S de los distintos operones, se amplificó esta región en cada uno de los fragmentos analizados. Así, se obtuvo, para cada operón, el patrón de los espaciadores reportados por Wang y col., (1997) (Figura 2c).

Estos resultados confirmaron que el método a ser utilizado era apropiado. Se probó que el ensayo de movilidad del heteroduplete (HMA) es un método confiable para detectar el polimorfismo en genes de rDNA16S.

Capítulo 2. Polimorfismo en el RNA ribosomal 16S obtenido de cultivos clonales de bacterias del género *Vibrio*.

2.1. Polimorfismo en los genes repetidos del rRNA 16S en bacterias del género *Vibrio*.

2.1.1. Polimorfismo en los genes repetidos de RNA ribosomal 16S en cepas tipo del género *Vibrio*.

Inicialmente se examinó el polimorfismo en cepas de colección del género *Vibrio*. Este examen mostró que los genes repetidos del rRNA 16S de estas cepas diferían en secuencia. El polimorfismo en estos genes se observó por la formación de heterodupletes después de la amplificación del rDNA 16S por PCR, como se describió en el capítulo anterior. Cuando se amplificó el rDNA 16S a partir de DNA de colonias de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se pudo observar después de electroforesis en poliacrilamida, al menos dos bandas con migración más lenta a la esperada para el producto (Figura 3a).

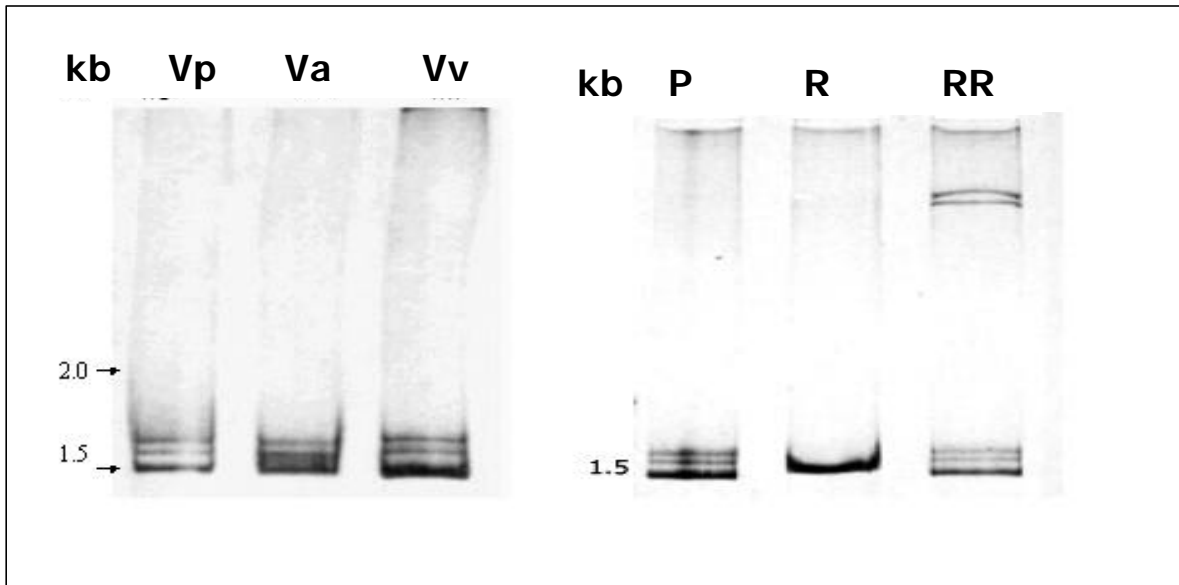


Figura 3. a) Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación por PCR del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*; carriles Vp, Va y Vv respectivamente. b) Resolución de los heterodupletes del producto observado más arriba de la banda de 1.5 kb luego de la electroforesis. Carril P, producto de la amplificación de *V. parahaemolyticus*; carril R, producto obtenido luego de un ciclo de amplificación de la muestra P diluído 1/10. Carril RR, producto obtenido después de la desnaturalización y renaturalización de la muestra R.

Como fue descrito previamente por Espejo y col., (1998), las bandas observadas con movilidad electroforética menor que los homodupletes corresponderían a heterodupletes. Estas formas se producen en el PCR después de la etapa de desnaturalización al enfriar para la alineación. En este proceso las hebras simples se separan y pueden realinearse cuando la temperatura disminuye en la etapa de alineación. Los heterodupletes se forman cuando se alinean hebras que no son 100% complementarias. La naturaleza de los heterodupletes de estas bandas pudo comprobarse sometiendo el producto de amplificación a una dilución apropiada (1/10) (Delwart y col., 1993) y a un ciclo único de amplificación. En estas condiciones los heterodupletes desaparecen porque la dilución al bajar la concentración, disminuye considerablemente la alineación de hebras simples del producto. Si el producto de esta reamplificación, que no muestra heterodupletes se somete a desnaturalización y renaturalización, nuevamente hay alineación de hebras no totalmente homólogas que forman heterodupletes. La figura 3b muestra los resultados obtenidos después de someter el amplificado del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus* a este procedimiento. El mismo resultado se obtuvo con el amplificado de las otras cepas tipo (no se muestran). Estos resultados indicaron la existencia de polimorfismo en al menos algunos de los rDNAs 16S de los operones *rrn* para cada una de las cepas examinadas. Basados en evidencias previas que relacionan el retardo en la migración electroforética de los heterodupletes con la disimilitud en secuencia (Espejo y col., 1998), el polimorfismo o la diferencia en secuencia pudo ser estimada entre un 2-3%. Sin embargo, el porcentaje de disimilitud se calcula considerando solamente la migración relativa de los heterodupletes formados por las especies de *Vibrio* (Figura 4), obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de disimilitud} = -12.96 \times \text{migración relativa} + 13.03.$$

Usando esta última ecuación, la disimilitud en secuencia intraorganismo observada en cada una de estas cepas, se estimó entre 0.6 a 1.1%.

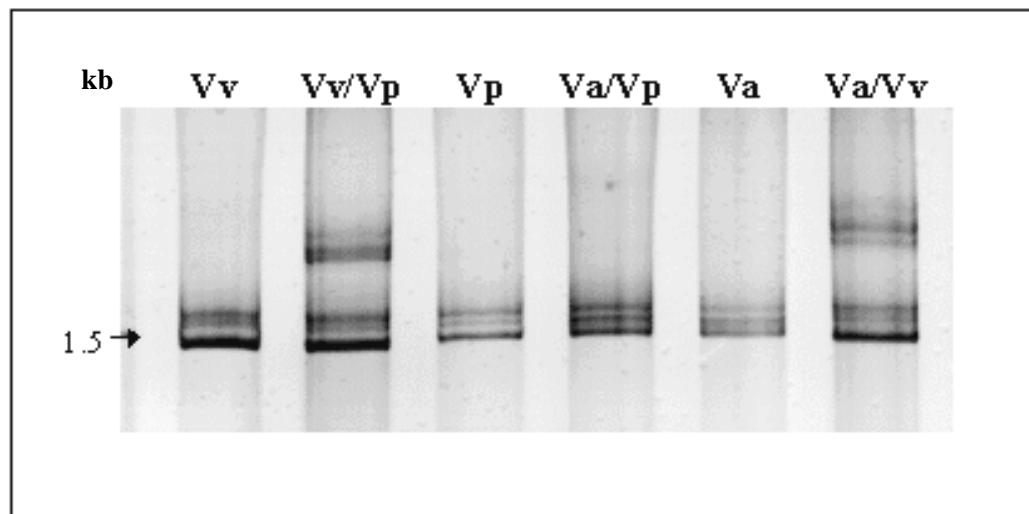


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida que muestra los heterodupletes formados en los productos de amplificación por PCR del rDNA 16S y en la hibridación entre amplificadores de cepas tipo diferentes. Los carriles Vv, Vp y Va muestran el producto de amplificación de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, respectivamente. Los carriles Vv/Vp, Va/Vp y Va/Vv, muestran el producto obtenido después de la desnaturalización y renaturalización entre el producto de amplificación de los pares correspondientes. La flecha indica el marcador de peso molecular.

2.1.2. Caracterización de los diferentes operones de *V. parahaemolyticus*: análisis de transferencia a membrana (Southern blot) y clonamiento del rDNA 16S.

Para caracterizar los operones *rrn* diferentes en *V. parahaemolyticus*, éstos se separaron por tratamiento de DNA total con la enzima de restricción *EcoRI* y electroforesis. Los operones *rrn* se ubicaron en el gel hibridando con una sonda para rRNA 16S después de transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Southern blot). El resultado reveló seis bandas claras, indicando la presencia de por lo menos seis operones en este genoma (Figura 5a).

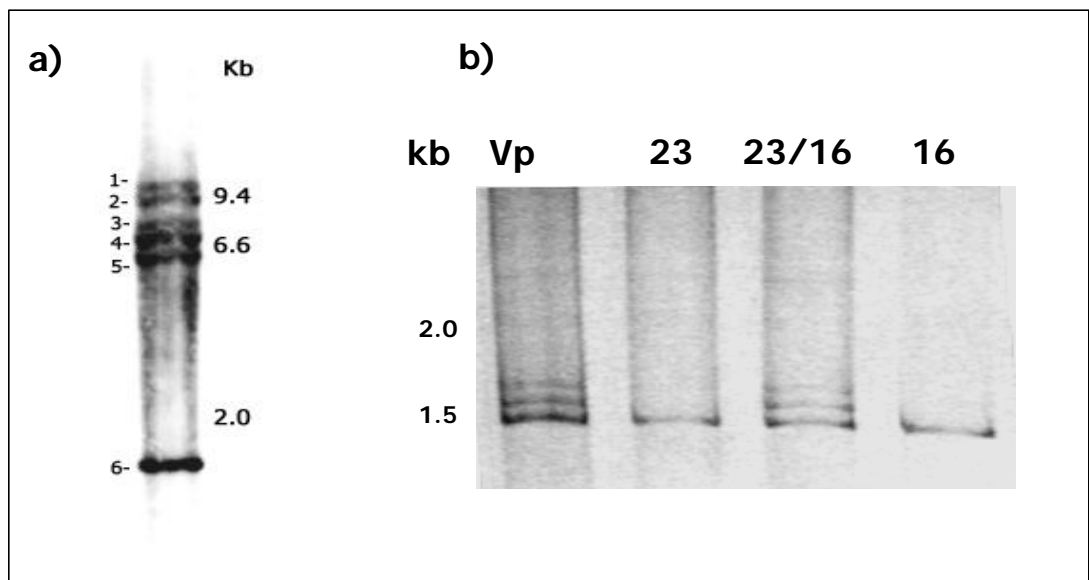


Figura 5. Southern blot y clonamiento de los diferentes rDNAs 16S de *V. parahaemolyticus*. a) Southern del DNA genómico de *V. parahaemolyticus* preparado de un cultivo, digerido con la enzima *EcoRI* e hibridado con una sonda específica para rDNA 16S. b) Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de la amplificación por PCR del rDNA 16S *V. parahaemolyticus* y de clones. Carril Vp, producto de amplificación del DNA genómico de *V. parahaemolyticus*; 23: producto de amplificación del DNA plasmidial del clon 23; 16: producto de amplificación del DNA plasmidial del clon 16; carril 23/16, producto obtenido después de la hibridación de los amplificadores del carril 23 y 16.

Posteriormente se examinó la homología entre el 16S rDNA en los distintos fragmentos aislados. El DNA correspondiente a las bandas 5 y 6 (Figura 5a) fue extraído, amplificado y los productos hibridados entre sí. Los heterodupletes observados indicaron que estos fragmentos contenían rDNA 16S con secuencias diferentes (resultados no se muestran). Adicionalmente y con el objeto de conocer los espaciadores en los distintos operones, se amplificó la región espaciadora entre los genes 16S y 23S para cada uno de estos fragmentos. Los resultados sugirieron que el fragmento 5 contenía al menos dos espaciadores, mientras que el fragmento 6 no contenía espaciador (Figura 6). Las posibles explicaciones para este último resultado son discutidas en la sección correspondiente.

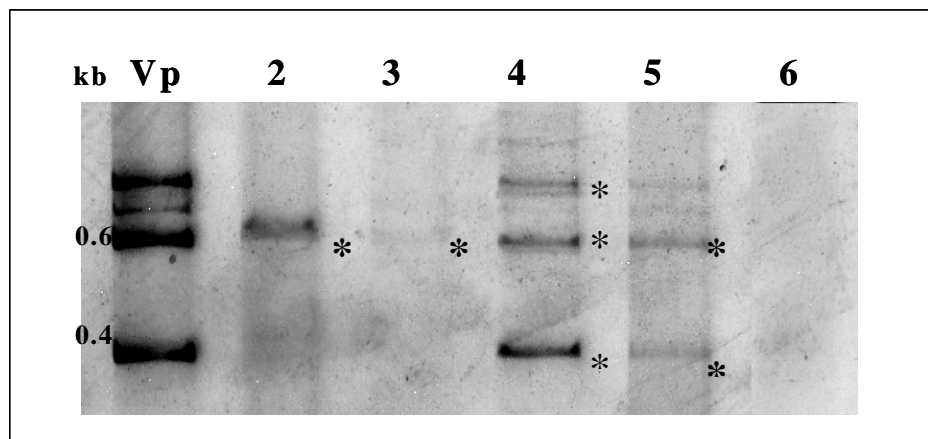


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida del amplificado de la región espaciadora entre los genes del rDNA 16S y 23S de *V. parahaemolyticus* ATCC. Los carriles 2, 3, 4, 5, y 6 son los amplificados de los fragmentos eluidos del gel paralelo al Southern blot de la Fig 5a, que contienen los operones *rrn* del 2 al 6 de *V. parahaemolyticus*. Vp corresponde al amplificado del DNA total de *V. parahaemolyticus*. El (*) indican la presencia de la banda.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de heterodupletes que indicaban la existencia de operones con rDNA 16S diferentes. Para comprobar esta indicación y

determinar la distribución de los sitios polimorfos, se clonaron y secuenciaron los amplificadores del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus*. El clonamiento se realizó con el vector TOPO TA como se describió en los Métodos. Los clones se agruparon según su secuencia por la capacidad de sus amplificadores del rDNA 16S de formar heterodupletes al hibridarlos. Los resultados mostraron que en la hibridación entre el amplificador del rDNA 16S de dos clones Vp23 y Vp16 se observaron tres bandas. Este patrón fue similar al obtenido después de la amplificación del rDNA 16S del genoma completo de *V. parahaemolyticus* (Figura 5b). La banda inferior corresponde al homoduplete y las bandas con migración menor son los heterodupletes. Como con sólo los amplificadores de dos clones se obtuvieron tres bandas, con un patrón muy similar al observado con el DNA total, es posible que el polimorfismo en esta cepa consista solamente de dos rDNAs 16S diferentes.

2.1.3. Secuenciación del rDNA 16S de los clones de *V. parahaemolyticus*.

Con el objeto de establecer la distribución de los sitios polimórficos en el rDNA16S, se secuenciaron los amplificadores del rDNAs 16S de los clones de *V. parahaemolyticus*. Se secuenciaron los clones Vp23 y Vp16 y los clones Vp44 y Vp27 que hibridaron igual que Vp23 y Vp16, respectivamente. Adicionalmente, también se secuenció el producto de amplificación del fragmento indicado como 6 en el Southern blot. El amplificador de este fragmento se comportó por hibridación igual que los de los clones 16 y 27. El análisis se realizó en un secuenciador automático, tal como se describió en Métodos. La región secuenciada para cada clon fue la comprendida entre los partidores Eubac 27f y 1492R

del rDNA 16S. Las principales diferencias entre las secuencias están resumidas en la Tabla I.

Tabla I. Comparación de las diferencias en secuencia entre los amplificadores del rDNA 16S de los clones de *V. parahaemolyticus* y del amplificado del rDNA 16S del fragmento de restricción F6.

Clon		VP27	F6	VP44	VP23	VP17802 ^T
VP16	H	0	0	2	2	Nr
	T	4	Nr	14	12	12
	RV2	0	0	11	10	7
VP27	H		Nr	2	2	Nr
	T		Nr	16	15	13
	RV2		0	11	10	7
F6	H			2	2	Nr
	T			Nr	Nr	Nr
	RV2			11	11	7
VP44	H				0	Nr
	T				5	19
	RV2				1	12
VP23	H					Nr
	T					16
	RV2					12

H indica el número de heterodupletes observados en la electroforesis en gel de poliacrilamida. **T**, indica el número total de diferencias que fueron encontradas por la comparación de 1514 sitios. **RV2**, corresponde a la región donde se concentraron el mayor número de diferencias, correspondiente a aquella entre los nucleótidos 440-496 (números de *E. coli*, Brosius y col., 1978). **Nr** no realizado. VP17802^T número de acceso que corresponde a la secuencia comunicada de *V. parahaemolyticus* ATCC (Ruimy y col., 1994)

En los resultados de los clones analizados se encontraron un total de 4 a 19 sitios polimórficos entre los rDNAs 16S. Según los resultados, del 63 a un 83% de los sitios polimorfos se concentraron en una región denominada RV2 (Tabla I) que corresponde a una región variable del RNA 16S y forma una estructura de stem loop (lazo y horquilla). La región RV2 abarca los nucleótidos 440-496 según los números en *E. coli* (Brosius y col., 1978).

Las secuencias nucleotídicas han sido depositadas en el banco de datos con los números de acceso: AF388386 (Vp23), AF388387 (Vp16), AF388388 (F44), AF388389 (Vp27) y AF388390 (F6).

2.1.4. Polimorfismo en los genes repetidos del RNA ribosomal 16S en aislados ambientales del género *Vibrio*.

Con el propósito de determinar el polimorfismo en aislados ambientales del género *Vibrio*, se obtuvo cepas de agua de mar y se analizaron por HMA. Este ensayo nos permitió evaluar un número grande de aislados ambientales. Los aislados seleccionados se agruparon dentro de este género por tener una similitud mayor o igual al 94% en su rDNA 16S con *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*. Este valor fue escogido de acuerdo a que el grado más alto de disimilitud que existe entre especies del género *Vibrio* es del 7% (*V. cholerae* con *V. parahaemolyticus*). La disimilitud se estimó por la migración relativa de los heterodupletes del rDNA 16S de cada aislado con las cepas tipo (Figura 7) en base a la relación retardo en migración electroforética de los heterodupletes con la disimilitud en secuencia (Espejo y col., 1998)

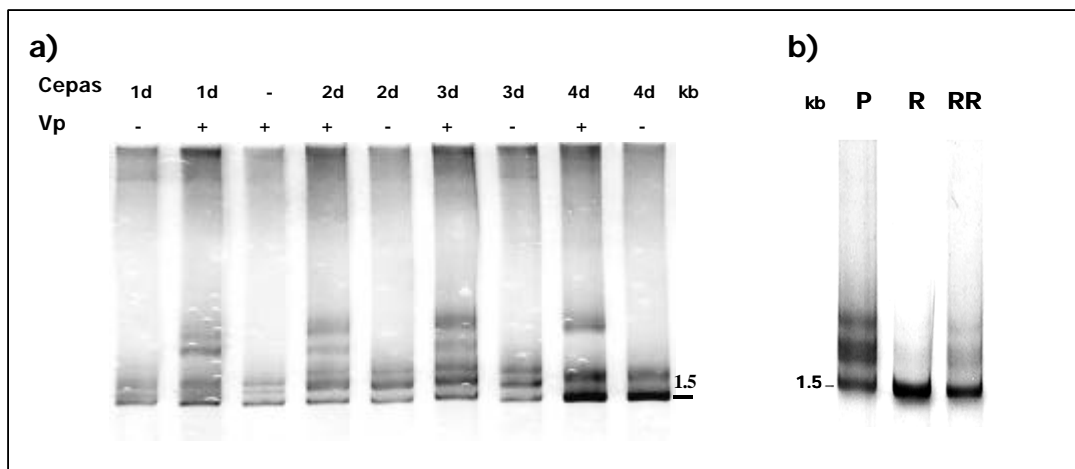


Figura 7. a) Electroforesis en gel de policrilamida del producto amplificado por PCR del rDNA 16S obtenido de algunas cepas ambientales de vibrio y su relación con el amplificado del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus*. Los carriles 1d/-, 2d/-, 3d/- y 4d/- contienen el producto de amplificación de aislados de vibrio. Los carriles 1d/+, 2d/+, 3d/+ y 4d/+ muestran el producto de la hibridación entre el amplificado del rDNA 16S de cada cepa con el de *V. parahaemolyticus*.

b) Resolución de los heterodupletes del amplificado del rDNA 16S de la cepa 3d. Carril P, producto de amplificación; R, producto obtenido después de un ciclo de amplificación del producto del carril P diluido; RR, producto obtenido después de la desnaturalización y renaturalización del producto del carril R. La posición del marcador de peso molecular se indica en kb.

Basándose en este criterio se seleccionaron 20 cepas como pertenecientes al género *Vibrio*. El rDNA 16S de estas cepas se amplificó y examinó por la formación de heterodupletes, que indica la existencia del polimorfismo. En cada cepa examinada se observó la presencia de bandas adicionales al homoduplete, correspondientes a los heterodupletes.

Se observaron al menos tres de estas bandas en 2 cepas, dos en 8 y una en 10 cepas. Los heterodupletes observados con algunas de estas cepas se muestran en la figura 7.

La observación del amplificado de las cepas (ver el carril 2d y 3d de la Figura 7) revela la presencia de heterodupletes con una migración menor a la observada en los heterodupletes obtenidos con *V. parahaemolyticus*. La migración de estos heterodupletes sugirió la existencia de una disimilitud mayor de 1.8% entre los genes del rRNA 16S de esta cepa. La naturaleza de los heterodupletes se evidenció por el ensayo de resolución, como se describió para las cepas tipo. La figura 7b muestra los resultados de estos ensayos hechos con la cepa 3d. Resultados similares se obtuvieron con las otras cepas (no mostrado).

La figura 6a también muestra los heterodupletes generados por la hibridación del amplificado del rDNA 16S de estas cepas con el de *V. parahaemolyticus*.

2.1.5. Clonamiento y secuenciación de los diferentes rDNAs 16S en la cepa 3d.

Con el objetivo de caracterizar los diferentes operones observados por HMA en la cepa 3d, se clonó y secuenció los clones del amplificado de su rDNA 16S. El clonamiento se realizó en el vector TOPO TA como se describe en Métodos. Los clones diferentes se distinguieron por la capacidad de sus amplificados del rDNA 16S de formar heterodupletes al hibridarlos. La figura 8 muestra los resultados de la hibridación entre los clones seleccionados por formar heterodupletes.

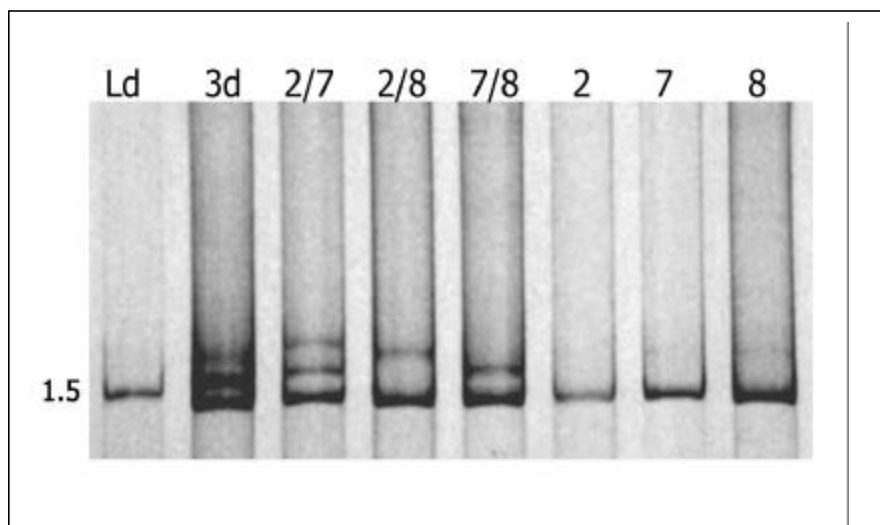


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los amplificadores del rDNA 16S de los diferentes clones de la cepa de vibrio 3d y del producto obtenido después de la hibridación entre ellos. Los carriles 3d, 2, 7 y 8 muestran los amplificadores del rDNA 16S de la cepa 3d y de los clones 2, 7 y 8. Los carriles 2/7, 2/8, y 7/8 muestran el producto de hibridación entre los amplificadores del rDNA 16S de los clones correspondientes. Ld muestra el marcador de peso molecular de 1.5 kb.

El patrón obtenido al hibridar el producto de los clones 2 y 7 fue similar al obtenido después de la amplificación del rDNA 16S del genoma completo de la cepa 3d (Figura 8 carril 3d). Esta observación sugirió que sólo la presencia de dos rDNA 16S diferentes podría explicar el patrón al amplificar el genoma. Sin embargo, sólo se obtuvo una banda de heteroduplete, en la hibridación de los amplificadores de cada uno de estos clones con un tercer clon denominado 3d8 (carriles 2/8 y 7/8). Esta última observación sugirió, en cambio, que el polimorfismo en la cepa 3d puede consistir al menos de tres diferentes rDNAs 16S o 3 operones ribosomales diferentes.

Con el propósito de establecer la distribución de los sitios polimórficos en el rDNA 16S, se secuenciaron los amplificadores del rDNAs 16S de los clones de la cepa 3d, incluyendo el clon 3d4 el cual resultó ser igual al clon 3d8 por análisis de heterodupletes.

Al igual que con el aislado de colección, se secuenciaron los clones del aislado ambiental 3d. El resultado de las diferencias observadas en la secuencia nucleotídica de los clones se resume en la Tabla II.

Tabla II. Comparación de las diferencias en secuencia entre los amplificadores del rDNA 16S de los clones de la cepa de *Vibrio* sp 3d.

Clon		3D8	3D4	3D7
3D2	H	1	1	2
	T	29	31	19
	RV1	13	13	0
	RV2	11	11	11
3D8	H		0	1
	T		5	20
	RV1		0	13
	RV2		1	4
3D4	H			1
	T			29
	RV1			13
	RV2			3

H indica el número de heterodupletes observados en la electroforesis en gel de poliacrilamida. **T**, indica el número total de diferencias encontradas por la comparación de 1514 sitios. **RV1** y **RV2**, corresponden a las regiones donde se concentraron el mayor número de diferencias: nucleótidos 70-96 y 440-496 (números de *E. coli*), respectivamente.

Los resultados indicaron diferencias totales entre los diferentes clones de 5 a 31 sitios.

Estos sitios se concentraron en dos regiones que forman estructuras de stem loops llamadas RV1 y RV2 en la Tabla II. Estas regiones se ubican entre los nucleótidos 70-96 y 440-496 del rRNA 16S respectivamente (Figura 9, números en *E. coli* de Brosius y

col., 1978). Es interesante destacar que la secuencia de la región RV1 fue idéntica a la examinada en los clones de *V. parahaemolyticus*.

Las secuencias nucleotídicas han sido depositadas en el banco de datos con los números: AF388391 (3d2), AF388392 (3d4), AF388393 (3d7) y AF388394 (3d8).

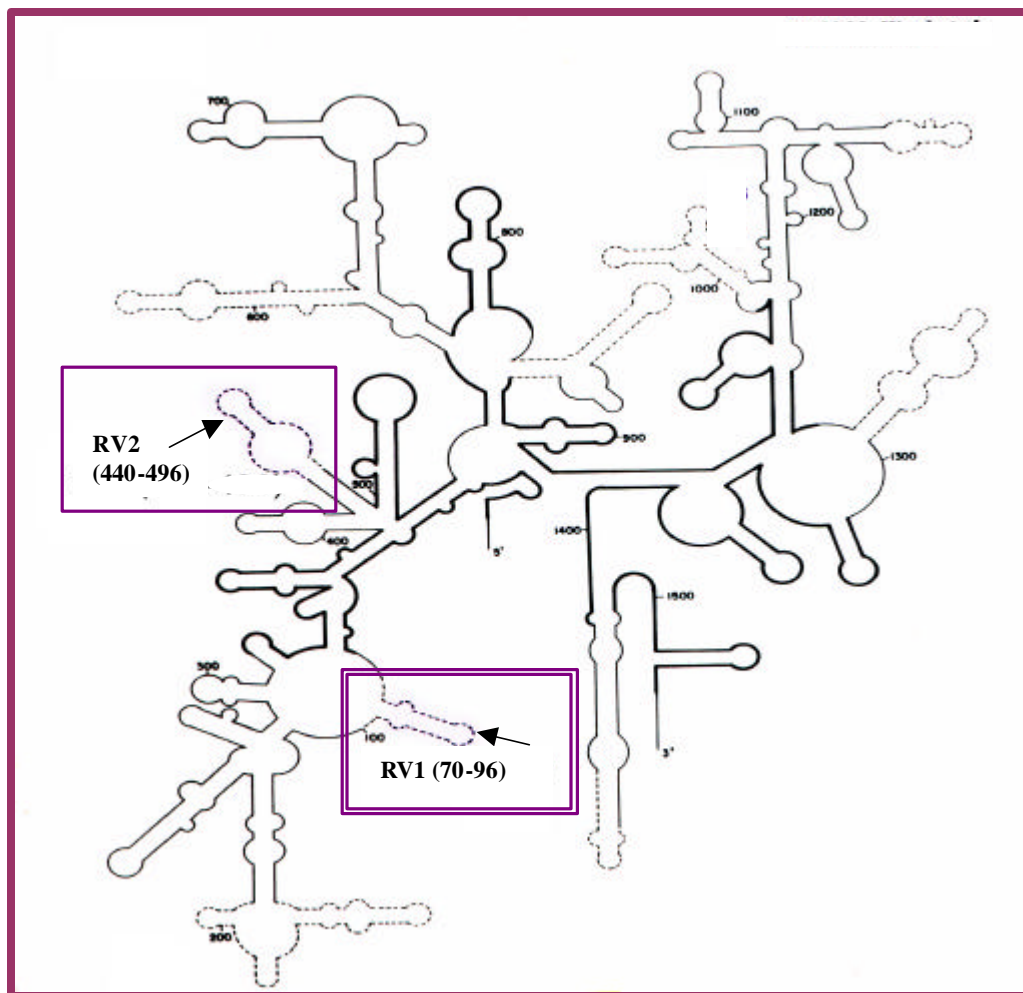


Figura 9. Ubicación de las regiones variables RV1 y RVII de las cepas de vibrio, sobre el esquema de la estructura secundaria del rRNA 16S de *E. coli* propuesto por Gutell y col.(1985). Los números indican la posición de los nucleótidos de acuerdo a la secuencia del rRNA 16S de *E. coli* (Brosius y col., 1978).

2.2. Determinación más sensible del polimorfismo por amplificación de la región que concentra sitios polimorfos.

Con el propósito de visualizar mejor el polimorfismo y habiendo encontrado que los sitios polimorfos se concentraban en regiones bien delimitadas, se amplificó un fragmento de 180 pb que contenía la región RV2. El fragmento se amplificó usando los partidores 357F y 518R como se indicó en los Métodos. La formación de heterodupletes se determinó por electroforesis en acrilamida como se describió antes (Figura 10).

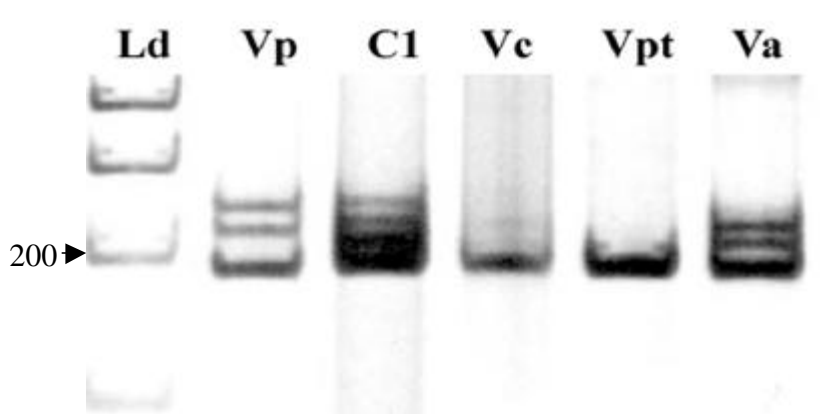


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos luego de la amplificación del fragmento de 180 pb del rDNAs 16S. Vp: amplificado del DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, C1: amplificado de la cepa ambiental C1, Vpt de *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086, Vc de *V. cholerae* ISP y Va de *V. alginolyticus* ATCC 17749. Ld corresponde al marcador de peso molecular 100 pb.

Como se esperaban las bandas correspondientes a los heterodupletes se observaron más claramente que amplificando gran parte del rDNA 16S. Las cepas con polimorfismo en su rDNA 16S son *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y la cepa ambiental C1. En la figura 10, también se muestra el amplificado de las cepas de *V. cholerae* ISP (carril Vc) y *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 (carril Vpt). En estos carriles a diferencia de los anteriores, se observó una sola banda correspondiente al homoduplete. Estos resultados indicaron que *V. cholerae* ISP y *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 contendrían genes rRNA 16S no diferenciables por secuencia. Estas fueron las únicas cepas analizadas del género en las que no se observaron heterodupletes.

La ausencia de heterodupletes en el amplificado de *V. cholerae* ISP, es consecuente con la ausencia de diferencias mayores en los ocho genes de rRNA 16S observada en la secuencia del genoma de la cepa de *V. cholerae* El Tor (Heidelberg y col., 2000), aunque se trata de dos cepas distintas. Al analizar la secuencia de los genes del rRNA 16S de la cepa El Tor, se observa que sólo uno de los ocho operones presenta sitios polimorfos en RV2. En los otros operones no se observó polimorfismo en esta región.

2.3. Polimorfismo observado por secuenciación directa del producto amplificado.

El polimorfismo también se pudo evidenciar al secuenciar directamente la región con polimorfismo en el producto de la amplificación del rDNA 16S. Luego del PCR el amplificado del rDNA 16S se purificó por Wizard y se secuenció parcialmente como se describe en los Métodos. El polimorfismo pudo ser observado en el electroferograma (Perfiles de secuencia) como picos de nucleótidos diferentes superpuestos (ver figura 11).

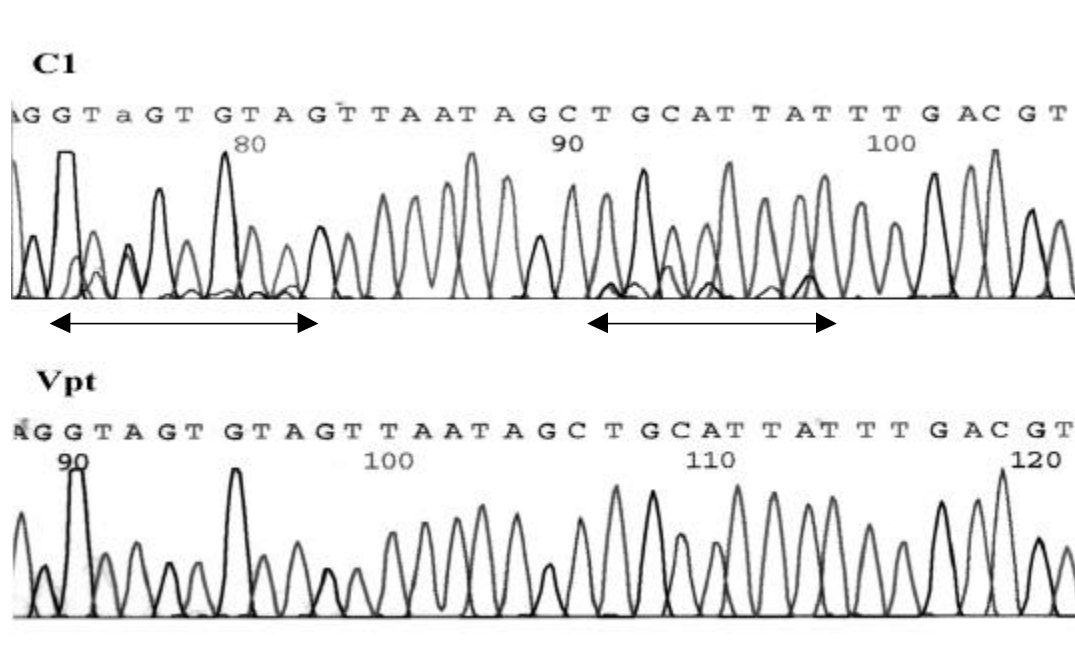


Figura 11. Perfiles obtenidos de la secuencia del fragmento de 180 bp del amplificado del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 (Vpt) y de la cepa ambiental C1 (C1). Este fragmento contenía la región comprendida entre los nucleótidos 450-485 en *E. coli*. La secuencia (considerando sólo los picos mayores) corresponde a: 5'AGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCATTATTTGACGT 3'. Las flechas muestran la región donde se encontraron los sitios superpuestos.

Los resultados de los electroferogramas de la región RV2 de *V. parahaemolyticus* RIMD y de la cepa ambiental C1, muestran que las secuencias son iguales cuando sólo se consideran los picos mayores al leer la secuencia. La comparación de la secuencia obtenida en esta forma con las otras existentes en el banco de datos para *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, mostró que era idéntica a la previamente reportada por Ruimy y col., (1994), pero diferente a la publicada por Dorsh y col., (1992) para la misma cepa. La secuencia obtenida en esta forma es también diferente a las secuencias de los clones de *V. parahaemolyticus* ATCC descritos anteriormente. Estas diferencias se muestran en la Tabla III.

Tabla III. Diferencias en secuencias entre los amplificadores del rDNA 16S comunicadas para *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. alginolyticus* ATCC 17749 con las secuencias obtenidas de la cepa de *V. parahaemolyticus* RIMD y la cepa C1.

		Vp SecDorsh	Clon Vp16	Clon Vp23	Vpt	C1	Va SecRuimy
Vp SecRuimy	T	32	12	16	Nr	Nr	2
	RV2	9	7	12	0	0	0
Vp SecDorsh	T		28	37	Nr	Nr	36
	RV2		4	13	8	8	8
Clon Vp16	T			12	Nr	Nr	14
	RV2			10	8	8	6
Clon Vp23	T				Nr	Nr	19
	RV2				12	13	10
VPt	T						Nr
	RV2						0
C1	T						Nr
	RV2						0

T indica el número total de diferencias que fueron encontradas al comparar 1514 sitios. **RV2**, corresponde a la región donde se concentraron el mayor número de diferencias entre los nucleótidos 440-496 (números de *E. coli*, Brosius y col., 1978).

Vpt y **C1** secuencias para 400 sitios de la cepa de *V. parahaemolyticus* RIMD y de la cepa C1. **Vp SecRuimy**, **Vp SecDorsh**, **ClonVp16** y **ClonVp23** secuencias reportada para *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 por Ruimy y col., (1994), Dorsh y col., (1992) respectivamente y los clones de este estudio; **Va SecRuimy** secuencia reportada para *V. alginolyticus* ATCC 17749 Ruimy y col., (1994) **Nr**: No realizado. Los colores resaltan las secuencias diferentes para la región RV2.

2.4. Polimorfismo en el rRNA.

Con el propósito de determinar una potencial expresión diferencial de los genes rRNA 16S diferentes, se determinó el polimorfismo directamente en el RNA ribosomal. El polimorfismo en el rRNA 16S se exploró por la observación de heterodupletes en el amplificado del rRNA luego de amplificación por RT-PCR. La figura 12 muestra que el patrón de heterodupletes obtenido por RT-PCR del RNA es indistinguible del obtenido de los genes por PCR directo. Estos resultados indicaron que los genes rRNA 16S diferentes son transcritos.

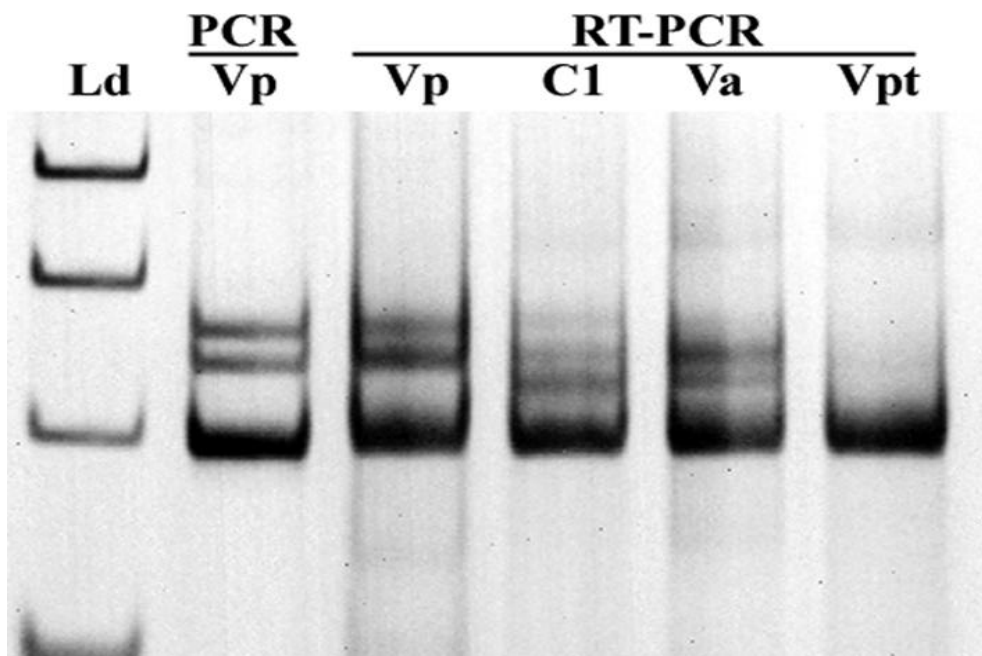


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos después de la amplificación por RT-PCR del RNA de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, cepa C1 de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* 17749 y *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 (carriles Vp, C1, Va, y Vpt, respectivamente). El producto de amplificación por PCR del DNA de *V. parahaemolyticus* en el carril PCR/Vp. Ld corresponde al marcador de peso molecular de escala 100 pb.

Capítulo 3. Vibrios patógenos

3.1. Presencia de genes asociados a la patogenicidad de *Vibrio* spp en aislados de agua de mar.

Con el objetivo de determinar la posible presencia de genes asociados a vibrios patógenos, se aislaron bacterias pertenecientes a este género desde agua de mar. Las bacterias se recolectaron de dos sitios diferentes de la costa chilena y en diferente época del año como se indicó en los Métodos.

Los análisis preliminares mostraron que las muestras de agua de mar contenían un total de 10^7 a 10^8 bacterias por ml cuando se observaban por microscopía. Sin embargo, solamente 2×10^2 a 3×10^3 bacterias/ml fueron capaces de formar colonias en agar marino, y menos, de 1-7 bacterias/ml crecieron en TCBS a 37 °C. De las bacterias recuperadas en TCBS y que resultaron ser oxidasa positivo, sólo un 10% correspondió al género *Vibrio*. Estos aislados se ubicaron dentro de este género por mostrar una similitud en la secuencia de sus rDNAs 16S mayor que 93% con cepas tipo de este género. El porcentaje de similitud se determinó por el ensayo de movilidad del heteroduplete, descrito anteriormente.

3.1.1. Caracterización de los aislados:

Los diversos aislados seleccionados se agruparon más finamente de acuerdo con el patrón de las regiones espaciadoras entre los genes del rDNA 16S y 23S. Los espaciadores son regiones altamente variables usualmente llamadas ITS. El patrón se obtiene por la amplificación de estas regiones por PCR usando partidores entre el

extremo 3' y el extremo 5' de los genes rDNA 16S y 23S y posterior separación de los diferentes productos por electroforesis. Este patrón ha permitido distinguir bacterias con alta resolución; y en algunos casos, aislados de la misma especie (Pizarro y col., 1996; Berthier y Ehrlich, 1998; Jensen y Straus, 1993). Por este método se distinguieron 20 grupos diferentes entre los diversos aislados y un aislado de cada grupo se escogió para su análisis. La figura 13 muestra algunos de los patrones obtenidos para los aislados de vibrio.

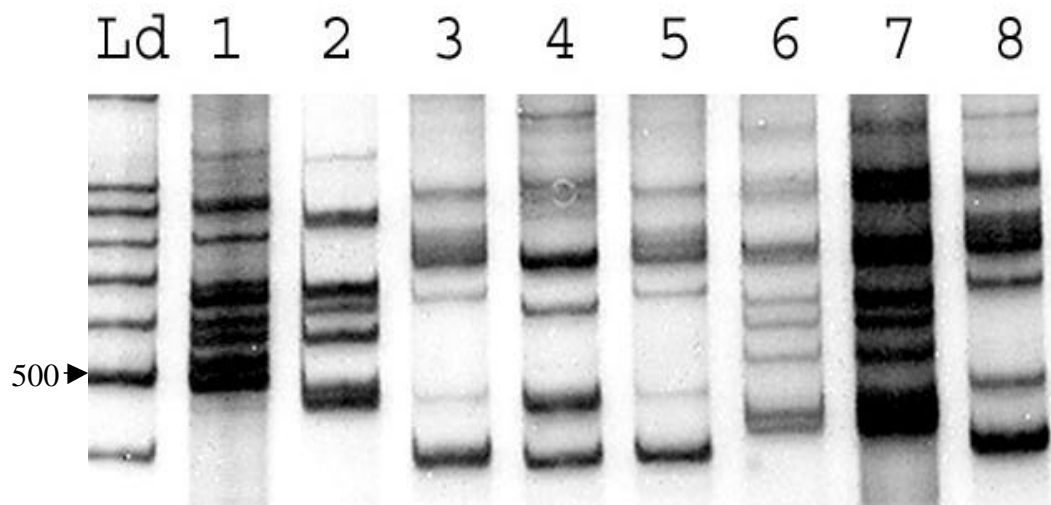


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes rRNA 16S y 23S del DNA extraído de los aislados de vibrio (carriles 1-8). Ld corresponde al marcador de peso molecular de escala 100 pb

Los aislados seleccionados se analizaron para buscar genes asociados con vibrios patógenos. Se probaron los siguientes genes, de acuerdo con los protocolos previamente descritos: *tdh* y *trh* (Suthienkul y col., 1995) y el gen *gyrB* relacionados con *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran y col., 1998); *vvhA* (Lee y col., 1999), relacionado con *V. vulnificus*; *ctxA* (Field y col., 1992), *tcpA* (Keasler y Hall, 1993) y la región espaciadora del 16-23S rDNA de *V. cholerae* (Chun y col., 1999).

Los resultados obtenidos indicaron que de los 20 aislados analizados solamente dos eran positivos por PCR para alguno de estos genes: uno amplificó para *gyrB* de *V. parahaemolyticus* y otro para el gen *vvhA* de *V. vulnificus*. Sin embargo, el producto obtenido luego de la amplificación del gen *vvhA* mostró una migración electroforética diferente del producto esperado y por tanto se consideró negativo.

3.1.2. Caracterización genética de la cepa C1.

El aislado C1, positivo para el gen *gyrB*, se estudió en más detalle para establecer su relación con la cepa patógena de *V. parahaemolyticus*. Se comparó su genotipo y fenotipo con los de las cepas tipo de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. alginolyticus* ATCC 17749 y *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086. Esta última cepa se incluyó dentro del estudio porque a diferencia de la cepa ATCC, es positiva para el gen *tdh*. *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 aunque es la cepa tipo de esta especie, es negativa por PCR para el gen *tdh* [comunicado personal del Dr. T. Honda].

El resultado obtenido después de la amplificación de la región específica del gen *gyrB* para *V. parahaemolyticus* reveló que el tamaño del fragmento amplificado de la cepa C1

era indistinguible por migración electroforética del fragmento amplificado de *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802) (Figura 14).

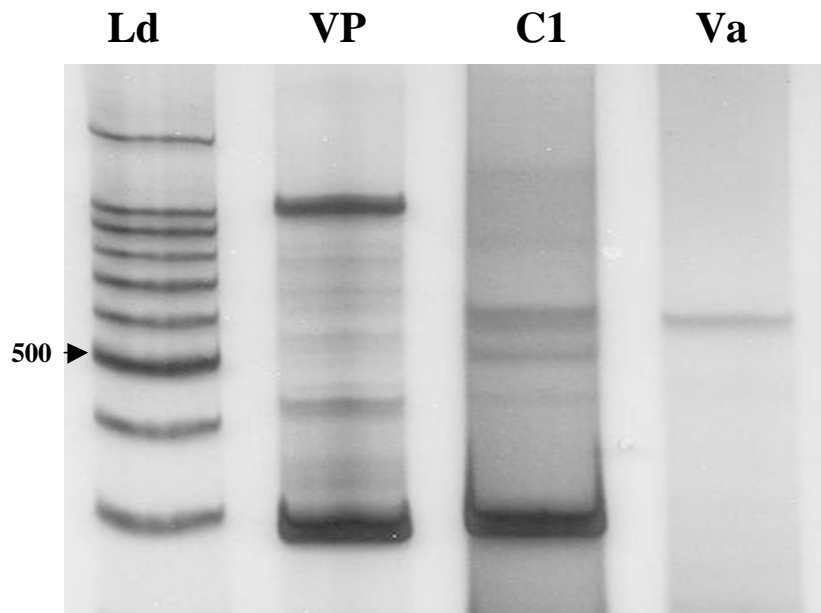


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos obtenidos de la amplificación por PCR del fragmento de 0.285 kb de *gyrB*. DNA extraído de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, cepa ambiental C1 y *V. alginolyticus* (carriles VP, C1, y VA, respectivamente). Ld corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

Con el objeto de comparar las secuencias entre los amplificadores de *gyrB* entre *V. parahaemolyticus* y C1 se efectuaron otros ensayos. Estos revelaron que ambos fragmentos eran indistinguibles por la movilidad del heteroduplete que estima el grado de disimilitud en la secuencia de estos fragmentos (no mostrado). Sin embargo, eran diferentes en RFLP. La cepa C1 no presentó los sitios de restricción para *CfoI* y *EcoRI*, presentes en el producto amplificado de *V. parahaemolyticus* (no mostrado).

Para establecer la homología en una región mayor del gen *gyrB*, se amplificó un fragmento de 1.2 kb en vez del fragmento de 0.285 kb. Este amplificado de la cepa C1 se comparó con el obtenido de las otras tres cepas por el ensayo de HMA. La similitud estimada por la migración relativa del heteroduplete (no mostrado), indicó que el amplificado de la cepa C1 se relacionaba más a *V. alginolyticus* que a *V. parahaemolyticus*. La disimilitud estimada para la región de 1.2 kb del gen *gyrB* fue de 3% con *V. parahaemolyticus* ATCC, 3% con *V. parahaemolyticus* RIMD y 1% con *V. alginolyticus*.

La cepa C1 también se comparó con las otras cepas por el patrón de espaciadores o ITS (Pizarro y col., 1996). El resultado mostró la aparente presencia de ITS contenidos tanto en *V. parahaemolyticus* como en *V. alginolyticus*, dentro del amplificado de la cepa C1 (Figura 15).

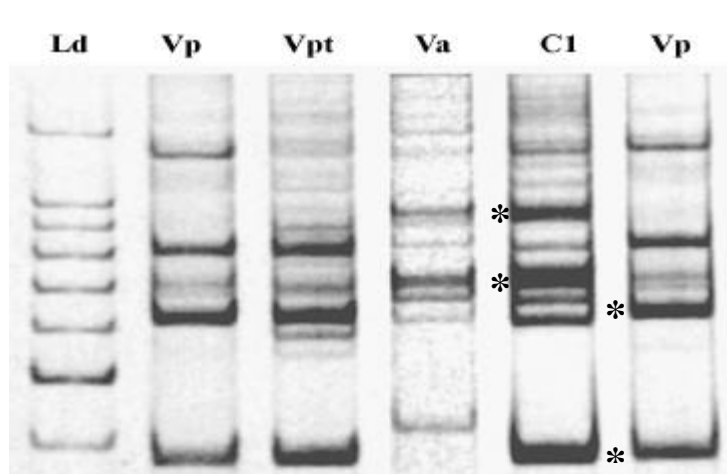


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos amplificados por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes rRNA 16S y 23S, del DNA extraído de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, de la cepa ambiental C1 y *V. alginolyticus*, (carriles Vp, C1, y Va respectivamente). Los (*) al lado izquierdo del carril de C1 señala los espaciadores de C1 también presentes en Va y al lado derecho los espaciadores de C1 también presentes en Vp. Ld corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

La caracterización genética se finalizó estableciendo la homología del DNA total entre la cepa C1 y las cepas *V. parahaemolyticus* ATCC y *V. alginolyticus*. Esta se determinó comparando la velocidad de reasociación del DNA entre pares, siguiendo el método descrito por De Ley (1970) ver Métodos. Los valores de similitud obtenidos fueron 70% para la cepa C1 y *V. alginolyticus* y 104 % con *V. parahaemolyticus* ATCC. Según estos valores, la cepa C1 correspondería a la especie *V. parahaemolyticus* más que *V. alginolyticus*.

3.1.3. Caracterización fenotípica de la cepa C1.

Se examinó la presencia de diferentes características fenotípicas que han sido relacionadas con la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*. Los resultados de algunas de estas propiedades se muestran en la **Tabla IV**. La cepa C1 fue negativa tanto para el gen de *tdh* como para la actividad ureasa, dos de las propiedades generalmente aceptadas como relacionadas con virulencia. Sin embargo ninguna de estas propiedades es absolutamente necesaria para ser patógeno. Por ejemplo: *V. parahaemolyticus* ATCC carece de *tdh* [comunicación personal del Dr. T. Honda y este trabajo, no mostrado] y *V. parahaemolyticus* RIMD carece de la actividad ureasa. Sin embargo, ambos presentan actividad hemolítica β .

La cepa C1 muestra otras propiedades relacionadas con patogenicidad como crecimiento en TCBS a 37 °C y muestra capacidad hemolítica en agar sangre, aunque en menor grado que *V. parahaemolyticus* ATCC o que *V. parahaemolyticus* RIMD. El crecimiento a diferentes temperaturas mostró algunas diferencias de la cepa C1 con *V. parahaemolyticus* ATCC y *V. parahaemolyticus* RIMD. La cepa C1 se pudo diferenciar principalmente por una mayor velocidad de crecimiento a bajas temperaturas. Calculando el ΔG de la gráfica de Arrhenius se obtuvieron 190 kJ/mol para la cepa C1 versus 344, 266 y 232 para *V. parahaemolyticus* ATCC, *V. parahaemolyticus* RIMD y *V. alginolyticus*, respectivamente (Figura 16).

Tabla IV. Propiedades fenotípicas de la cepa C1

Cepa Bacteriana				
Prueba	Vp	Vpt	Va	C1
Motilidad	+	+	+	+
Flagelo polar	+	+	+	+
Crecimiento en TCBS	+	+	+	+
	(V)	(V)	(A)	(A/G) ^a
Oxidasa	+	+	+	+
O/129, zona de inhibición	+	+	+	-
Hidrólisis de urea	+	-	-	-
Crecimiento en:				
0% NaCl	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	+	+
D-Glucosa, producción de gas	-	-	-	-
Formación de ácido:				
Glucosa	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	+	(Va) ^b
Swarming (Agar marino 25°C)	+	+	(Va)	+
Hemólisis Beta	+	+	-	-

^a Colonia amarilla y / o verde.

^b Resultados variables.

Vp: *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), Vpt: *V. parahaemolyticus* (RMID 2210086), C1: cepa C1, Va: *V. alginolyticus* (ATCC 17749).

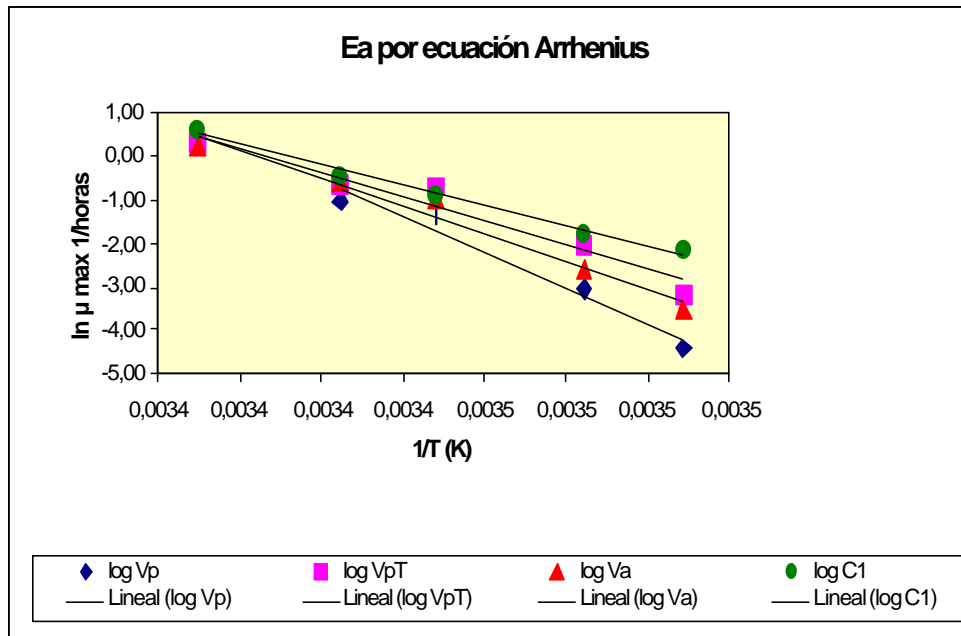


Figura 16. Gráfica de Arrhenius mostrando la dependencia de μ_{\max} (h^{-1}) versus la temperatura en *V. parahaemolyticus* ATCC (Vp), *V. parahaemolyticus* RIMD (VpT), *V. alginolyticus* (Va) y la cepa C1.

3.2. Presencia de bacteriófagos asociados a vibrios patógenos

3.2.1. Aislamiento de fagos que infectan bacterias del género *Vibrio*.

Un factor importante en los resultados observados era la posible transferencia lateral de genes, por lo que se exploró la presencia de bacteriófagos que pudieran transducir genes bacterianos.

Para determinar la presencia de bacteriófagos que podrían infectar aislados de vibrio obtenidos de agua de mar, se determinó la presencia en algunas muestras la actividad lítica sobre algunos de los aislados ambientales obtenidos. Por este procedimiento se detectaron dos fagos activos contra los aislados de vibrio Φ C1 y Φ 11. Sólo se estudió en mayor detalle Φ C1 porque mostró un rango de huésped más amplio. La actividad de este fago en la cepa C1 se determinó infectando estas células en medio líquido. La actividad lítica se midió por la disminución del crecimiento bacteriano con respecto de un cultivo control no infectado (Figura 17).

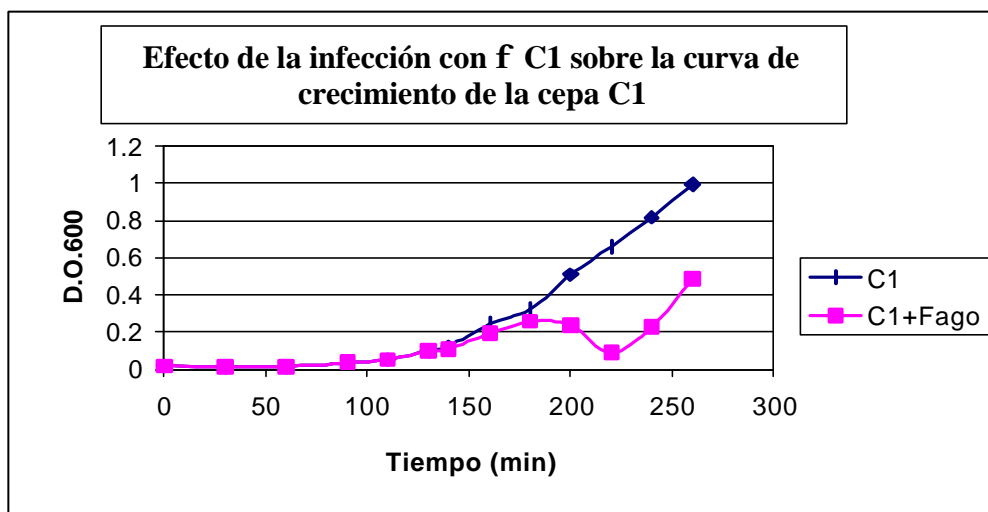


Figura 17. Efecto de la infección con Φ C1 sobre la curva de crecimiento de la cepa C1.

En los diferentes experimentos se observó que la disminución en el crecimiento bacteriano debido a la adición del fago fue seguida por una rápida recuperación. Esta rápida recuperación del crecimiento después de la lisis sugirió que podría tratarse de un fago lisogénico.

3.2.2. Rango de huésped de los fagos aislados

Con el objeto de determinar si este fago podría infectar otras cepas, se realizó el mismo ensayo con algunas cepas tipo del género *Vibrio*. Los resultados mostraron que el fago Φ C1 podía infectar *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, obteniéndose una lisis mayor con la cepa de *V. alginolyticus*. Para la cepa de *V. parahaemolyticus* se lograron obtener placas de lisis.

Al igual que lo observado para la infección sobre la cepa C1, en *V. alginolyticus* se presenta una rápida recuperación del cultivo después de la disminución en Absorbancia debida a la lisis (Figura 18).

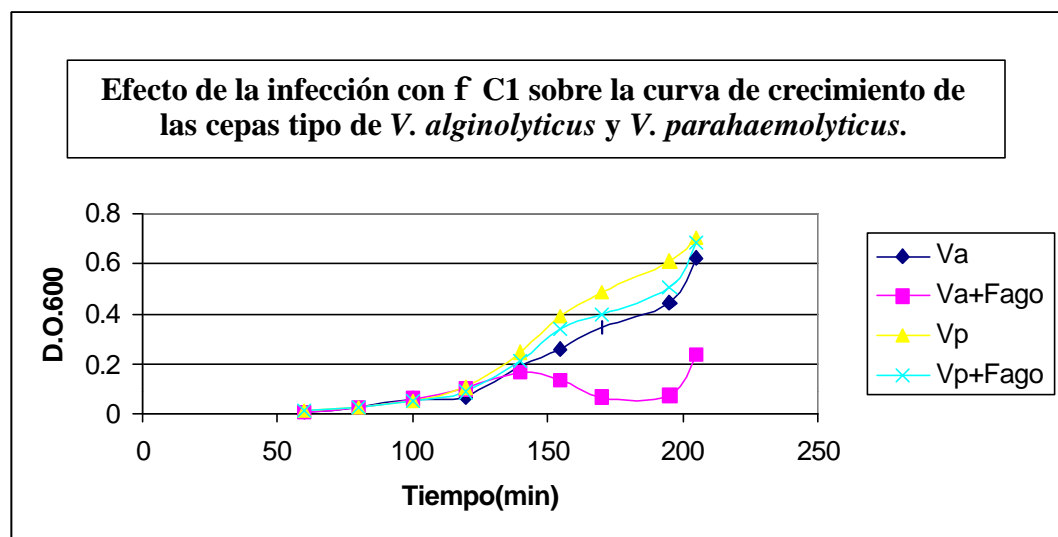


Figura 18. Efecto de la infección con Φ C1 sobre la curva de crecimiento de las cepas tipo de *V. alginolyticus* (Va) y de *V. parahaemolyticus* (Vp).

3.2.3. Caracterización genética del F C1.

Con el objeto de caracterizar el fago C1 a partir de los cultivos infectados se colectaron lisados crudos por tratamiento con cloroformo al 0.1% los cuales fueron titulados mediante ensayos de actividad lítica en placas por el método del doble agar (Ver Métodos). Este método sin embargo, no permitió obtener placas de lisis en forma reproducible y no permitió definir un título para el lisado crudo evaluado. La imposibilidad de obtener placas de lisis en forma reproducible podría deberse a varias causas y para explorarlas, se realizaron varias experiencias:

1) Se buscaron formas replicativas (RF) del fago en las bacterias que sobrevivieron a la infección. Las formas replicativas (RF) constituyen un mecanismo de lisogenia de algunos bacteriófagos y han sido comunicados como estructuras virales presentes en *V. parahaemolyticus* temperados o lisógenos (Chang y col., 1998). La resolución de las RF en geles de agarosa no permitió distinguir diferencias entre lo observado para cultivos infectados y control. Por lo tanto fue imposible aceptar o rechazar la posibilidad de lisogenia por la conformación de formas replicativas.

2) Se intentó inducir la replicación de un potencial profago. Se ha demostrado que la luz solar y otros factores permite la inducción y la transmisión del fago CTX ϕ en *V. cholerae* (Faruque y col., 2000). En el presente estudio se realizaron ensayos de inducción variando las condiciones de crecimiento del medio de cultivo e inducción con agentes químicos como la mitomicina C (ver Métodos). La posible inducción fue seguida determinando la rapidez de crecimiento. Los resultados no indicaron una clara inducción de lisis en los cultivos.

3) Se probaron clones de la bacteria huésped, en búsqueda de una cepa sensible incapaz de ser lisogenizada por el fago. Se reiniciaron los ensayos de infección a partir de una colonia obtenida de los cultivos caracterizados inicialmente y en un medio que contenía 10 mM de $MgCl_2$. Esto permitió observar nuevamente una aparente lisis por disminución de la absorbancia y placas de lisis. Pero los títulos obtenidos fueron muy bajos (9×10^2 UFP/ml).

Finalmente, en los sobrenadantes de cultivos infectados tratados con nucleasas se analizó la presencia de ácidos nucleicos que pudieran corresponder a genomas del fago,. El análisis de los extractos con fenol cloroformo de estas preparaciones reveló la presencia de ácidos nucleicos sólo en los cultivos infectados con fagos. El ácido nucleico fue sensible a DNAsa y resistente a RNAsa sugiriendo que es un fago DNA.

3.2.4. Observación del Φ C1 por microscopía electrónica.

La presencia de fagos fue también examinada por microscopía. Los cultivos fueron infectados y tratados para enriquecer la preparación en fagos como se describió en Métodos. Las muestras fueron observadas por fijación negativa y examinadas en un microscopio electrónico Philips CM100. Se observaron estructuras de cabeza hexagonal probablemente icosaédrica y con una cola o corto tallo (Figura 19).

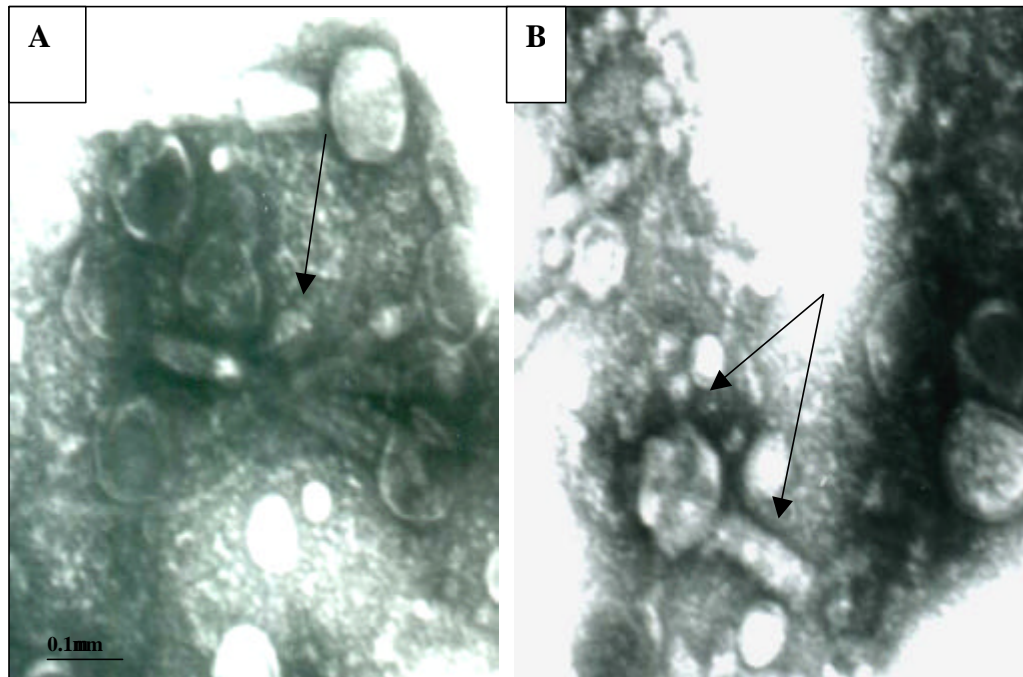


Figura 19. Microscopía electrónica de Φ C1. Panel a) Muestra un grupo de estructuras del Φ C1. b) Φ C1, las flechas indican la cabeza hexagonal y un tallo corto.

3.2.5. Propiedades de *V. parahaemolyticus* C1.

Previamente se había observado que en la cepa C1 era posible distinguir dos morfotipos que se relacionaban con el crecimiento de la colonia con o sin “swarming” sobre placas de agar marino. Sin embargo, la caracterización molecular de estos morfotipos determinó que ambos correspondían únicamente a variantes morfológicas observadas de forma ocasional. Ensayos de plaqueo de cultivos de la cepa C1 infectado con el fago y un cultivo control sin inóculo, permitieron observar que al parecer existe una posible asociación entre el morfotipo y la sensibilidad al fago. En el cultivo control se observa la presencia de colonias con swarming, mientras que para las mismas diluciones del cultivo infectado dichas colonias disminuyen sensiblemente (Figura 19).

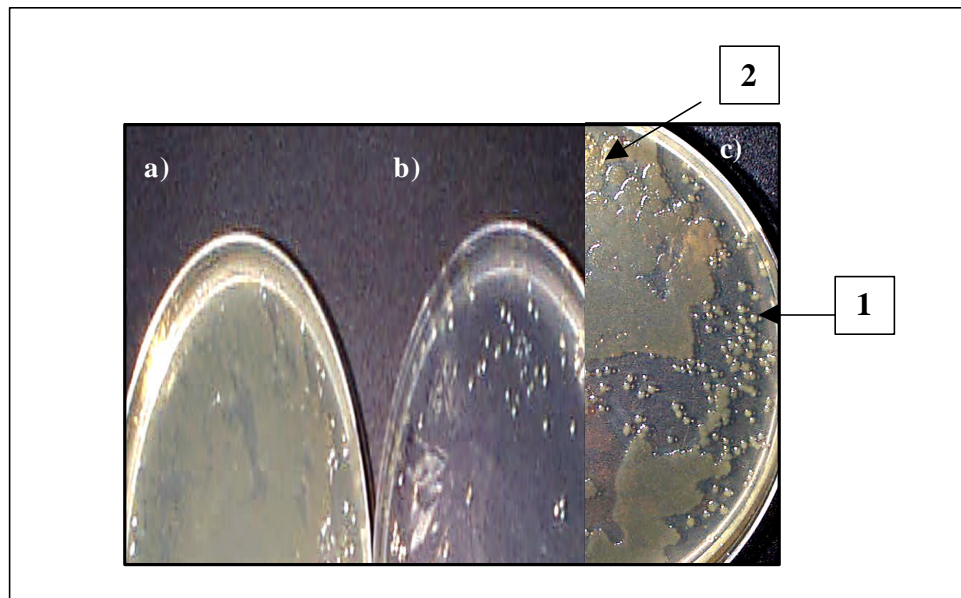


Figura 20. Visualización de los morfotipos de *V. parahaemolyticus* C1 en agar marino: **a)** cultivo de la cepa C1 no inoculado. **b)** cultivo de C1 inoculado con Φ C1. **c)** Agar marino con cultivo mostrando los dos morfotipos de la cepa C1. **1)** Indica colonia redondeada uniforme **2)** Colonia de bordes irregulares con “swarming”.

DISCUSION

El desarrollo de esta tesis contribuyó al cumplimiento de su objetivo general, demostrar que aislados del género *Vibrio* poseen propiedades concordantes con la existencia de una alta transferencia génica horizontal y que habitan en un ambiente donde existen bacteriófagos que pueden efectuar estas transferencias. El trabajo se discute de acuerdo a dos partes principales: el polimorfismo en los genes repetidos del RNA ribosomal 16S y la presencia de vibrios patógenos en aislados de la costa chilena.

1. Polimorfismo en los genes repetidos del RNA ribosomal 16S

Detección y prevalencia del polimorfismo.

La detección de heterodupletes después de la amplificación del rDNA 16S por PCR del DNA purificado de las cepas bacterianas permitió detectar el polimorfismo en estos genes. Los resultados indicaron que esta es una prueba confiable como indicador de la presencia de polimorfismo en un organismo particular con polimorfismo conocido (*T. bispora*) y en cepas tipos y aislados ambientales del género *Vibrio*.

Este método permitió explorar la presencia de polimorfismo en un gran número de aislados ambientales y de cepas tipo del género *Vibrio*. Se demostró que el polimorfismo en los diferentes operones ribosomales del rDNA 16S es un fenómeno común entre especies bacterianas de este género. El polimorfismo intragenómico encontrado es de alrededor de un 1-2%, estimado por la migración relativa de los heterodupletes y

posteriormente confirmado por la secuencia de nucleótidos del rDNA 16S de los clones de la cepa 3d y de *V. parahaemolyticus* ATCC (Tablas I y II).

El polimorfismo fue detectado en el amplificado del 16S de las cepas analizadas (Figuras 2-5, y 7) por la presencia de productos con menor migración que el homoduplete. La presencia de genes rRNA 16S diferentes se pudo observar también al hibridar el amplificado de algunos fragmentos conteniendo diferentes operones observados en el Southern blot (Figura 5a), y el amplificado de los clones del rDNA 16S de *V. parahaemolyticus* (Figura 5b) y de la cepa 3d (Figura 8). Es importante notar que la ausencia de polimorfismo en el producto amplificado del rDNA 16S de los clones, observado tanto por la formación de heterodupletes o al determinar la secuencia, indica que el polimorfismo comunicado no es generado durante la amplificación del PCR. Las diferentes observaciones de los productos de hibridación de los amplificados de los clones indicaron que el número de bandas de heterodupletes no corresponde al número de genes que difieren en secuencia. Como se muestra en la figura 5b, los híbridos complementarios formados por la cadena negativa de un amplificado y la positiva del otro pueden tener diferente migración, y de esta forma sólo dos rDNAs 16S pueden producir dos heterodupletes (Espejo y col., 1998). Esto se ejemplifica bien por la hibridación de los amplificados de los clones de la cepa 3d, donde sólo dos DNAs pueden generar dos heterodupletes con diferente migración electroforética. La formación de heterodupletes con migración electroforética más lenta que el homoduplete probablemente se debe a la interrupción de la doble hélice por regiones de hebra simple o de lazo y horquilla, en la región donde se concentran las variaciones o polimorfismo.

Al analizar las secuencias obtenidas para la región RV2 de los clones de *V. parahaemolyticus* (Figura 21), con el programa de modelamiento de estructura secundaria MFOLD para el RNA, se obtuvieron dos conformaciones más probables.

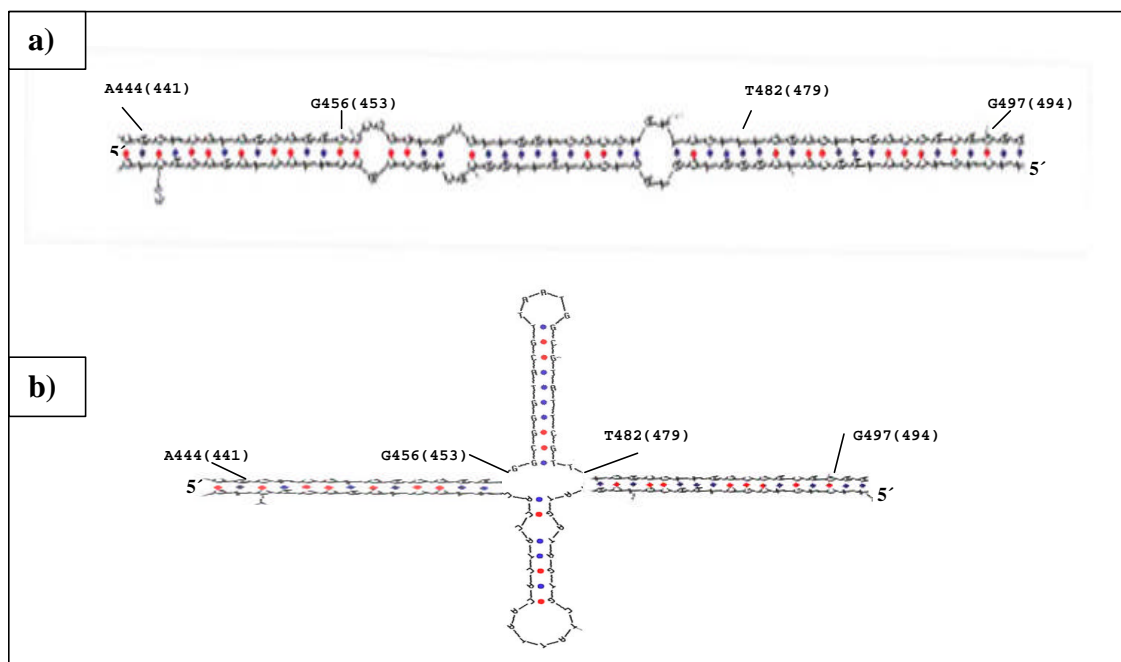


Figura 21. Esquema de posibles conformaciones de RV2, obtenidas con el programa MFOLD para la secuencia de los clones Vp27 y Vp44. a) La doble hélice con algunas regiones no apareadas. b) Regiones de lazos y horquillas. Los paréntesis indican los números correspondientes en *E. coli*

Cualquiera de éstas podría ser responsable del retardo en la migración de los heterodupletes en el gel de poliacrilamida. Se estima que sólo cuando las diferencias fueron de por lo menos 8 nucleótidos en estas regiones, fue posible observar el retardo de los heterodupletes en los geles de poliacrilamida (Tabla I y II).

Características del polimorfismo

En la caracterización de los diferentes operones en *V. parahaemolyticus* (Figura 6) se pudo observar que algunos contenían espaciadores del rDNA 16S-23S diferentes. El operón u operones contenidos en el fragmento 2 contenía un espaciador y los fragmentos 3-5 del Southern blot contenían por lo menos dos espaciadores. El fragmento 6 en cambio, no mostró espaciadores entre el rDNA 16S y el 23S. No es posible sin embargo, afirmar que este fragmento contenía un operón *rrn* y podría al igual que en *V. cholerae* consistir de un rDNA 16S aislado. Durante el desarrollo de esta tesis se publicó un trabajo con la descripción de los espaciadores para la cepa *V. parahaemolyticus* IFO, se describieron 6 tipos de espaciadores diferentes (Maeda y col., 2000). En este trabajo para la cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC, se observaron por amplificación cuatro espaciadores de tamaño similar a los descritos en la cepa IFO, correspondientes a los espaciadores de aproximadamente 390, 630, 700 y 800 pb. Esta variedad de espaciadores es comparable a la comunicada para *V. cholerae* N16961, en la cual se describieron cinco tipos de espaciadores diferentes (Heidelberg y col., 2000).

El análisis comparativo de las secuencias para los rDNA 16S obtenidas de los diferentes clones de *V. parahaemolyticus* y de la cepa 3d, reveló detalles de la heterogeneidad entre los operones ribosomales. Los sitios nucleotídicos polimorfos del rRNA 16S se encontraron concentrados en dos regiones hipervariables en la cepa 3d (RV1 y RV2) pero solamente en una de éstas (RV2) en la cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Estas dos regiones han sido reconocidas como regiones hipervariables tanto entre rRNAs 16S de diferentes especies bacterianas (Gray y col., 1984) como de especies del género *Vibrio* (Dorsch y col., 1992). En las pocas otras especies en que se ha observado el

polimorfismo aquí descrito, la concentración de sitios polimorfos puede ocurrir en diferentes regiones. En cepas de *Streptomyces*, el polimorfismo se concentra en la región designada como hélice 10 que incluye los nucleótidos 180 a 200 (números de *E. coli* Ueda y col., 1999). En *Paenibacillus polymixa*, se concentra en las regiones V6 y V8 del rDNA 16S entre los nucleótidos 997 a 1044 y 1257 a 1278 respectivamente (Números de *E. coli* Nubel y col., 1996). Estas regiones son, sin embargo, bastante conservadas en *V. parahaemolyticus* y en la cepa 3d.

Coelho y col. (1994) utilizando la región variable entre los nucleótidos 61 a 106 (números en *E. coli*), que contiene la región RV1, separaron las especies del género *Vibrio* en dos grupos. Un grupo en que esta región es corta, de aproximadamente 44 pb, cuya cepa prototipo sería *V. cholerae*, y otro con una región más larga, que contiene 55 pb, cuyo prototipo es *V. parahaemolyticus*. De los resultados obtenidos en este trabajo todos los clones tanto de *V. parahaemolyticus* como la cepa de 3d tienen la región larga.

Origen del polimorfismo.

Existen dos secuencias diferentes comunicadas para *V. parahaemolyticus* ATCC (Ruimy y col., 1994 y Dorsch y col., 1992). El análisis de los clones de esta cepa (este trabajo) permitió distinguir dos secuencias adicionales diferentes en el genoma. La secuencia descrita por Ruimy y col., (1994) es idéntica en la región RV2 a la descrita para *V. alginolyticus* ATCC 17749 (Ruimy y col., 1994), y para la secuencia obtenida del amplificado total de *V. parahaemolyticus* RIMD y de la cepa ambiental *V. parahaemolyticus* C1, considerando sólo los picos mayores observados en el electroferograma (Tabla III). La presencia de la misma región en cepas u operones

diferentes podría ser consecuencia de la transferencia lateral de esta región. La transferencia de una corta región y no del gen completo por recombinación de cortos segmentos ha sido planteada por Wang y Zhang, (2000).

Algunos autores han comunicado que los operones de rRNA tienden a ser concentrados cerca del origen de replicación (*oriC*) sobre el cromosoma bacteriano: *E.coli* posee cuatro de siete operones *rrn*, *B. subtilis* tiene siete de diez localizados cerca del origen. (Cole y Saint Girons, 1994; Stratz y col 1996). En *V. cholerae* encontramos cinco de ocho operones *rrn* localizados cerca del origen (Heidelberg y col., 2000). Esto puede sugerir que operones rRNA por virtud de su elevada concentración en la célula durante la replicación del cromosoma, serían blancos para la recombinación entre las secuencias de los genes no polimorfos y polimorfos.

Muchas de las sustituciones observadas en esta región muestran compensación de bases “covariación” que permite la preservación de la estructura secundaria y probablemente, también de la función. La acumulación de muchos cambios compensatorios en la región de lazo y horquilla implica que la divergencia de las diferentes versiones de este lazo y horquilla es relativamente muy antigua. Esta divergencia podría ser el resultado de un proceso de selección o de la transferencia lateral de genes que evolucionaron independientemente en otras bacterias. Ambas explicaciones son atractivas. Por otro lado, la posibilidad de que el polimorfismo sea debido a transferencia lateral es interesante, sugiriendo que este fenómeno es común en *Vibrios* marinos. La propuesta de una alta transferencia horizontal de genes de rRNA esta siendo cada vez más aceptada. Algunos estudios han mostrado que esta transferencia no es impedida por la coevolución del rRNA con los numerosos componentes del aparato traduccional con los que debe

interactuar (Lawrence, 1999; Asai y col., 1999). Se ha sugerido que uno de los diferentes rDNAs 16S encontrados en *T. chromogena*, fue adquirido de *T. bispora* o de un organismo relacionado vía transferencia horizontal de genes (Yap y col., 1999). Similarmente se ha postulado que la región *rrnE* de subespecies de *Salmonella* I pueden corresponder a *E. coli* (Perez y col., 1998).

El análisis de los aislados seleccionados indicó que existe una gran diversidad de espaciadores, al menos 6 espaciadores de diferente tamaño dentro del género *Vibrio* (Fig. 13). Anteriormente se había mencionado la existencia tanto en *V. cholerae* como *V. parahaemolyticus* de diferentes tipos de espaciadores. Otros géneros en cambio, a pesar de contener varios operones ribosomales como *B. subtilis* o *E. coli* sólo tienen dos tipos de espaciadores (Maeda y col., 2000). En *V. cholerae* Lan y Reeves (1998) han sugerido que los diferentes ribotipos serían el resultado de una alta recombinación entre los diversos operones. Por los datos obtenidos se sugiere que esto puede ser un fenómeno común entre las especies del género *Vibrio*.

Expresión de los genes polimorfos.

El análisis por transcriptasa reversa y amplificación (RT-PCR) del RNA indicó que al menos algunos de los diferentes genes son transcritos a RNA ribosomal. Estos datos sugieren que no habría una transcripción diferencial de los distintos genes. Sin embargo, sólo una condición de crecimiento fue analizada y es posible que en algunas condiciones especiales exista transcripción diferencial que seleccione por ribosomas más convenientes a esas condiciones. En algunos casos, diferencias en la secuencia de las regiones río-arriba de cada operón pueden inferir un patrón de regulación diferente para

los operones ribosomales. Hirvonen y col., (2001) ha demostrado que en *E. coli* diferentes elementos y factores transcripcionales pueden contribuir diferencialmente y pueden actuar a través de distintos mecanismos para la expresión de cada promotor. Así mismo observaciones pioneras en *B. subtilis* indicaron una expresión diferencial de los operones ribosomales, dependiente de la velocidad de crecimiento. (Rudner y col., 1993) Klappenbach y col., (2000) han relacionado el número de copias de genes con la velocidad en la cual diversas bacterias relacionadas filogenéticamente, responden a la disponibilidad de recursos. Adicionalmente, es concebible que el tener rDNAs 16S polimorfos pueda constituir una ventaja selectiva para la bacteria. Por ejemplo, esto podría implicar la posibilidad que una bacteria con diferentes genes rRNA 16S pueda responder diferencialmente a la presencia de compuestos que interactúan con los ribosomas bacterianos, tales como algunos antibióticos. Una revisión de los sitios en el rRNA 16S bacteriano asociados con la resistencia a antibióticos (Hu y Ochi, 2001; Recht y col., 1999) mostró que ninguno de éstos corresponde a los sitios RV1 y RV2 observados en la cepa 3d y en *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, se ha demostrado que los sitios nucleotídicos 76-90 y 456-476 en el rRNA 16S de *E. coli* (regiones que corresponden RV1 y RV2 respectivamente), son requeridas para una interacción específica con la proteína S4, la secuencia de la horquilla entre los nucleótidos 456-476 (RV2) es importante para la unión de S4 y puede ser reconocida directamente por la proteína. (Sapag y col., 1990). La proteína ribosomal S4 es esencial para el ensamblaje del ribosoma y puede actuar tanto como un factor transcripcional como traduccional. (Torres y col 2001). La proteína S4 regula autógenamente la expresión de otras proteínas ribosomales por unión al mRNA policistrónico, entre los sitios de unión

de S4 al mRNA y al rRNA no hay una homología detectable en la secuencia, pero si tendrían una similaridad estructural según Davies y col., (1998). Los sitios variables en el rRNA, podrían interactuar con afinidad diferente por S4. La posibilidad que existan diferentes S4 uniéndose al rRNA 16S parece poco probable. Esta parece ser una proteína muy conservada no polimorfa. Entre las secuencias comunicadas de la proteína S4 en *E. coli* y *V. cholerae* no se encontró diferencias.

Consecuencias del polimorfismo observado.

El análisis de la secuencia del rRNA 16S es de gran importancia para la taxonomía bacteriana. La clasificación filogenética moderna de los procariotes está basada en la presunción que los cambios en rRNA 16S reflejan la evolución de los microorganismos. La interpretación de estos datos de secuencias puede ser cada vez más complicado por la presencia de polimorfismo dentro de un mismo organismo y actualmente toma mucha importancia en el estudio de poblaciones microbianas en muestras ambientales. Al realizar una comparación por BLASTN de las dos secuencias más diferentes de los clones de la cepa 3d con las existentes en el banco de datos, se encontró que sólo 6 de las diez secuencias más relacionadas fueron comunes para ambos clones (ver Anexo).

Artículos previos utilizaron regiones comprendidas dentro de RV1 y RV2 para el diseño de sondas específicas de especies en el género *Vibrio* (Dorsch y col., 1992). Estas sondas, por el polimorfismo intragenómico detectado, no son adecuadas para este propósito.

Las técnicas modernas permiten cada vez estudiar con mayor precisión y más finamente lo que puede estar ocurriendo en un sistema: si el amplificado del rDNA 16S de un clon

es secuenciado, el polimorfismo puede no ser detectado. La secuencia obtenida directamente del amplificado del DNA por PCR puede mostrar ambigüedades debido a las variabilidades interoperones, que puede no ser consideradas.

Los resultados de estos y otros estudios de polimorfismo intra-cromosómico en el rDNA 16S pueden tener implicaciones en los análisis filogenéticos basados en las secuencias de rRNA. Aunque estos resultados pueden no ser un serio problema en el establecimiento de distancias dentro del árbol filogenético (Woese y col. 1990), el potencial efecto del polimorfismo puede considerarse en las relaciones a nivel de especies y subespecies o entre especies pertenecientes a géneros muy relacionados.

2. Vibrios patógenos en la costa chilena.

Abundancia de Vibrios: Presencia de genes asociados a la patogenicidad de *Vibrio spp* en aislados de agua de mar.

Estudios previos han mostrado la presencia y expresión de diferentes genes de virulencia de vibrios patógenos en otras especies ambientales (Chakraborty y col., 2000). Uno de los objetivos en este trabajo fue determinar la posible existencia de un reservorio de genes asociados a la patogenicidad de vibrios que podría eventualmente por acumulación de todos los genes requeridos transferidos lateralmente, generar cepas de vibrio potencialmente patógenas.

Los análisis preliminares mostraron que las muestras de agua de mar contenían vibrios (cultivables) pero no fue posible detectar genes específicos de vibrios en las muestras directamente previo al enriquecimiento por cultivo. Estos resultados podrían deberse a

que es muy baja la cantidad de vibrios en las muestras o poca eficiencia de los métodos empleados.

De acuerdo a los resultados la frecuencia de genes asociados con patógenos en agua de mar de la costa chilena es muy baja, al menos en las muestras analizadas. La ecología de los vibrios sugiere que su aparición es muy dependiente de las condiciones ambientales, especialmente la temperatura. En Chile la temperatura del agua permanece casi constante (12-14°C) durante el año, condición que favorecería que no se establezcan posiblemente los vibrio patógenos. Los resultados obtenidos sugieren que aunque la presencia de genes relacionados con patogenicidad es escasa, los aislados obtenidos podrían corresponder a especies consideradas como patógenos humanos.

La amplificación por PCR aunque ha sido descrita como un método rápido y confiable para la detección de vibrios patógenos y generalmente considerado más sensible que sondas de DNA (Venkateswaran y col., 1998) tiene sus limitaciones. Se pueden generar falsos positivos posiblemente por contaminación del DNA o falsos negativos derivados por inhibidores del PCR o baja especificidad. En los resultados se encontró un producto de amplificación no específico para el gen de *vvhA* de *V. vulnificus*, estudios adicionales serían necesarios para determinar su relación en la patogénesis de vibrios. Tampoco se puede desechar que la ausencia de amplificación para los genes estudiados pueda ser por una limitación del método empleado.

Caracterización de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* C1:

Los resultados obtenidos indicaron que de los aislados analizados solamente uno fue positivo por PCR para algunos de los genes asociados con patogenicidad. La cepa C1 contenía el gene *gyrB*, relacionado al de *V. parahaemolyticus*. Esta cepa se caracterizó

en detalle y resultó ser un *V. parahaemolyticus*, pero con algunas características de *V. alginolyticus* y que no contenía todo el conjunto de genes considerados necesarios en una especie realmente patógena.

Se observó la presencia de algunos espaciadores de *V. alginolyticus* y de *V. parahaemolyticus* en la cepa ambiental de *V. parahaemolyticus* C1. Este resultado no es sorprendente. *V. parahaemolyticus* aparentemente contiene nueve copias rDNA 16S y se han descrito al menos seis tipos de ITS diferentes [Maeda y col., 2000]. Esta gran diversidad en una misma cepa podría haberse generado por una alta recombinación entre los diversos operones, en la misma forma como ha sido sugerido para *V. cholerae* (Lan R. y Reeves, 1998). La cepa C1 presentó también espaciadores ausentes en las otras dos especies que pudo haber adquirido por recombinación entre operones o por transferencia. Fenotípicamente y genotípicamente *V. parahaemolyticus* C1 parece ser una mezcla de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*. Aunque altamente especulativo, el fago ϕ C1 podría corresponder a un fago transductor capaz de transferir lateralmente genes entre bacterias relacionadas generando mezclas como la observada en *V. parahaemolyticus* C1. Estas observaciones en conjunto apoyarían la hipótesis de alta transferencia horizontal y de presencia fagos transductores posiblemente responsables de esta transferencia.

Caracterización de ϕ C1

V. parahaemolyticus C1 resultó ser hospedero de un fago que denominamos ϕ C1. El análisis de éste indicó que se trata de un fago DNA con una cabeza icosaédrica y un tallo corto semejante a los fagos descritos en *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*

(Koga y col., 1982; Muramatsu y Matsumoto, 1991) con un amplio rango de huésped. Las características de la infección y de las placas de lisis sugieren que se trata de un fago lisogénico. Se ha especulado que la lisogenia ofrece ciertas ventajas a los fagos y cepas bacterianas en el mar. Puede contribuir a la distribución de características genotípicas y fenotípicas en la población portadora. Aunque aún es tema de discusión, algunos autores consideran que las ventajas que ofrece la lisogenia en ambientes oligotróficos y con una densidad baja de portadores, como es el caso del ambiente marino, determinarían la prevalencia de esta interacción (Jiang y Paul, 1998; Wommack y Colwell, 2000).

Aunque se probaron varios métodos, no fue posible sin embargo inducir los potenciales fagos temperados desde cepas sobrevivientes a la infección.

Variación de fase de *V. parahaemolyticus* C1

La variación de fase es un mecanismo que ha sido previamente descrito en diversas bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *Bordetella pertusis* y *E. coli*. Este fenómeno se asocia frecuentemente con la modificación de factores de virulencia, que entre otros, incluye cambios en la estructura y conformación de estructuras como flagelos y pilis (Snyder y Champness, 1997). La variación de tipo morfológico observada para la cepa C1 puede corresponder a este tipo de comportamiento, pues se relaciona con la aparición de flagelos peritricos. En este caso, la relación de la variación morfológica y la resistencia al fago podría deberse a la desaparición de los receptores para el fago. Esta interrogante queda planteada como una posibilidad que debe ser explorada en el estudio posterior del fago. Para este objeto se requeriría previamente definir las condiciones que determinan el cambio de fase de las colonias en el medio de cultivo y la interacción de los morfotipos con el fago.

CONCLUSIONES

1. El polimorfismo en los rDNAs 16S de los diferentes operones ribosomales es un fenómeno común en especies bacterianas del género *Vibrio* y es fácilmente detectado por el ensayo de la migración electroforética (HMA).
2. El polimorfismo intragenómico en el género *Vibrio* es de alrededor de un 2%, acorde con el análisis de la migración del heteroduplete y del análisis de las secuencias.
3. Los sitios polimorfos están concentrados en una región variable del rRNA 16S bacteriano que forma stem loop (lazo y horquilla). Esta región concentra hasta un 83% de pares de sitios polimorfos.
4. Dos hipótesis pueden explicar el polimorfismo observado: un proceso de selección de cepas polimorfas o una frecuente transferencia horizontal de regiones de genes ribosomales entre bacterias de este género.
5. La presencia de vibrios patógenos en las aguas costeras chilenas es escasa. Aunque es posible aislar bacterias con genes asociados a vibrios patógenos, éstas no parecen ser cepas realmente virulentas.
6. *V. parahaemolyticus* C1, un aislado ambiental, hospeda un fago ϕ C1 con amplio rango de huésped, similar a los descritos para *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.
7. *V. parahaemolyticus* C1 tiene un mecanismo de variación de fase posiblemente relacionado con la sensibilidad a infección por el fago ϕ C1.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, R. I., Ludwig, W. y K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Amaro, C., Biosca, E.G., Fouz, B., Toranzo, A.E. y E. Garay. 1994. Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice, *Infect. Immun.* 62, 759-763.
- Asai, T., Zaporozets, D., Squires, C. y C. L. Squires. 1999. An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: Complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 1971-1976.
- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E. y B. Citterio. 2000. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *Int. J. Food. Microbiol.* 54, 9-18.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, C., Katouli, M., Kühn, I., Möllby, R., Bruscolini, F. y G. Donelli. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio spp.* and non-01 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl Environm Microbiol.* 65, 2748-2753.
- Berthier, F. y S.D. Ehrlich. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS. Microbiol. Lett.* 161, 97-106.
- Birnboim, D. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.
- Boyd, E.F., Moyer, K., Shi, L. y M. Waldor. 2000. Infectious CTX ϕ and vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: Evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infec. Immun.* 68, 1507-1513.
- Brosius, J., M. L. Palmer, P.J. Kennedy y H.F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 4801-4805.
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, K., Bhadra, K., Ghosh, N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, M., Takeda, Y., Colwell, R. y B. Nair. 2000. Virulence Genes in environmental strain of *Vibrio cholerae*. *Appl Environm Microbiol.* 66, 4022-4028.
- Chang, B., H. Taniguchi, Miyamoto H. y S. C. Yoshida. 1998. Filamentous Bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. *J. Bacteriol* 180, 5094-5101.
- Chun, J., Huq, A. y R.R. Colwell. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl Environm Microbiol.* 65, 2202-2208.

- Cilia, V., Laffay, B. y R. Christen. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analysis at the species level. *Mol Biol Evol* 13, 451-461.
- Clayton, R.A., G. Sutton, Hinkle, P.S. Bult, J.C. y C. Fields. 1995. Intraspecific variation in small subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokariotic taxa?. *Int J Syst. Bacteriol.* 45, 595-599.
- Coelho, A., Momen, H., Vicente, A. y Salles. 1994. An analysis of the V1 and V2 regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* 16S rRNA. *Res Microbiol.* 145, 151-156.
- Cole, S.T. y S. Girons. 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 14, 139-160.
- Collins, C., Lyne, P. y J. Grange. *Vibrios, aeromonas and plesiomonas*, In *Microbiological Methods Sixth Edition*, Butterworth-Heinemann, 1991, pp. 250-258.
- Collins, C.H. y Lyne P. *Microbiological Methods 6ed*, Butterworth & Co (ed) Ltd, 1989.
- Colwell, RR. 1996. Global climate and infections disease: the cholera paradigm. *Science* 274, 2025-2031.
- Dahllof, I., Baillie, H. y S. Kjelleberg. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraespecies heterogeneity. *Appl Environm Microbiol.* 66, 3376-3380.
- Davies, C., Gerstner, R., Draper, D.E., Ramakrishnan, V. y W. White. 1998. The cristal structure of ribosomal protein S4 reveals a two-domain molecule with an extensive RNA-binding surface: one domain shows structural homology to the ETS DNA-binding motif. *The EMBO J.* 17, 4545-4558
- De Ley, J., Cattoir, H. y A. Reynaerts. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, *Eur. J. Biochem.* 12 133-142.
- Delwart, E. L., Shpae, E. G., Louwagie, J., McCutchan, F. E., Grez, M., Rübnsamen-Waigman, H. y J. I. Mullins. 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 *env* genes. *Science.* 262, 1257-1261.
- DePaola, D. W. Cook, J. E. Veazey, Hunsucker, J:C:, Garthright, W. E., Blodgett, R. J. y S. J. Chirtel. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environm Microbiol.* 64, 1459-1465.
- Deriu, A., Sechi, LA., Molicotti, P., Spanu, Ml. y S. Zanetti. 2002. Virulence genes in halophilic *Vibrio spp.* Isolatesd in common mussels. *New Microbiol.* 25, 93-96.
- Doore D. 1992. Preparation of genomic DNA, Section I. Short Protocols in *Molecular Biology 2^{da} Edition*, USA, pp. 2-4.
- Dorsch, M., Lane, D. y E. Stackebrandt. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 58-63.

- Doyle, M. P., Beuchat, L.R. y T. Montville. 1997. Food Microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press. Washinton D.C. 228-264.
- Droge, M. Puheler, A. y W. Selbistshka. 1998. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. J Biotechnolgy. 64, 75-90.
- Espejo, R. T, Feijóo, C. G., Romero, J. y M. Vásquez. 1998. PAGE Analysis of the Heteroduplexes formed Between PCR Amplified 16S Ribosomal RNA Genes: Estimation of Sequence Similarity and rDNA complexity. Microbiology. 144, 1611-1617.
- Faruque, S.M., Asadulghani, M.M. Rahman, M.K. Waldor y D.A. Sack. 2000. Sunlight-Induced Propagation of the Lysogenic Phage Encoding Cholera Toxin. Infect. Immunol. 68, 4795-4801.
- Faruque, S.M., Roy, S.K., Alim, A.R., Siddique, A.K. y M.J. Albert. 1995. Molecular Epidemiology of toxigenic *Vibrio cholerae* in bangladesh Studied by numerical analysis of rRNA gene restriction patterns. Journal of clinical microbiol. 33, 2833-2838.
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S. y R. Cavicchioli. 1998. Implications of rRNA Operon Copy Number and Ribosome Content in the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. Appl Environm Microbiol. 64, 4433-4438.
- Field J., Popovic P., Wachsmath K. y O. Olsvik. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 strains from the Latin American cholera epidemic, J. Clin. Microbiol. 30, 2118-2121.
- Gray, M. W., Sankoff, K. y R.J. Cedergren. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: A global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunits ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 12, 5837-5852.
- Gutell, R.R., Weiser, B., Woese, C. R. y H.F. Noller. 1985. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Pro. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 32:155-216.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., Mcdonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C. y O. White. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 406, 477-483.
- Hirvonen, C., Ross, A. W., Wozniak, C. E., Marasco, E., Anthony, J. R., Aiyar, S. E., Newburn, V. H. y R. L. Gourse. 2001. Contributions of UP Elements and the Transcription Factor FIS to Expression from the Seven *rrn* P1 Promoters in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183, 6305-6314.
- Hu, H. y K. Ochi. 2001. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. Appl Environm Microbiol. 67, 1885-1892.

- Huang, Z., Fasco, M.J. y L.S. Kaminski. 1996. Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *Bio. Techniques*. 20, 1012-1020.
- Huss, V.A., Festl, U. y K. Heinz. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates, *System. Appl. Microbiol.* 4, 184-192.
- Ichige, A. J., Matsutani, S., Oshi K. y S. Mizushima. 1989. Establishment of gene transfer systems for and construction of the genetic map of a marine vibrio strain. *J. Bacteriol.* 171, 1825-1834.
- Jensen, M. A. y N. Straus. 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl.* 3, 186-194.
- Jiang, S.C. y J.H. Paul. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environm Microbiol.* 64, 2780-2787.
- Kaneko, T. y R., Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113, 924-32.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. y M. Levine.. 1995. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 48-86.
- Karaolis, D.K., Somara, S., Maneval, J., Johnson, J.y J. Kaper. 1999. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-iv pilus and a phage receptor in cholerae bacteria. *Nature.* 399, 375-379.
- Kaspar, C.W. y M. Tamplin. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environm Microbiol.* 59, 2425-2429.
- Keasler, S.P y R.H. Hall. 1993. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. *Lancet.* 341, 1661.
- Kim, Y.B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. y M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol.* 37, 1173-1177.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M. y T.M. Schmidt. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environm Microbiol.* 66, 1328-1333.
- Koga, T., Toyoshima, S. y T. Kawata. 1982. Morphological varieties and host ranges of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages isolated from seawater. *Appl Environm Microbiol.* 44, 466-70.
- Koutsoumanis, K., Taoukis P., Drosinos E.H. y G.E. Nychas. 2000. Applicability of Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO₂ packagig on the spoliage microflora of fish. *Appl Environm Microbiol.* 66, 3528-3534.
- Kovacikova, G. y K. Skorupski. 2000. Differential Activation of *tcpPH* promoter by AphB determines biotype Specificity of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 182, 3228-3238.

- Kuwae, T. y Y. Hosokawa. 1999. Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: Relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Appl Environm Microbiol.* 65, 3407-3412.
- Lamfrom, H., Sarabhai, A. y J. Abelson. 1978. Cloning of *Benecke* genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 133, 354-363.
- Lan, R. y Reeves P.R. 1998. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology.* 144, 1213-1221.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, pp 115-175
- Lawrence, J. G. 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol.* 2, 519-523.
- Lee, J.Y., Bang, B., Rhee, J.H. y S.H. Choi. 1999. Two Stage Nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples. *J. of Food Scie.* 64, 158-162.
- Lida, T., Park, K.S, Suthienkul, O., Kozawa, J., Yamaichi, Y., Yamamoto, K. y T. Honda. 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology.* 144, 2517-2523.
- Linkous, D. y Oliver, J.D. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett.* 174, 207-214.
- Maeda, T., Takada, N., Furushita, M. y T. Shiba. 2000. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett.* 192, 73-77
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. A. y J. Davies. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 280, 605-608.
- Mooi, F.R. y E.M. BiK. 1997. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trens Microbiol.* 5, 161-165.
- Motes, M.L., DePaola, A., Cook, D.W., Veazey, J.E., Hunsucker, J.C., Garthright, W.E., Blodgett, R.J. y S.J. Chirtel. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl Environm Microbiol.* 64, 1459-1465.
- Muramatsu, K y H. Matsumoto. 1991. Two generalized transducing phages in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol Immunol.* 35, 1073-84
- Mylvaganam, S. y P. P. Dennis. 1992. Sequence heterogeneity between the two genes encoding 16S rRNA from the halophilic archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. *Genetics.* 130, 399-41.
- Nasu, H., Iida, T. y T. Sugahara. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* 03:k6 strains. *J Clinic Microbiol.* 38, 2156-2161.

- Nishibuchi, M. y J. Kaper. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immunity*: 63, 2093-2099.
- Nishibuchi, M., Janda J.M. y T. Ezaki. 1996. The thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) of *Vibrio hollisae* is dissimilar in prevalence to and phylogenetically distant from the *tdh* genes of other vibrios: implications in the horizontal transfer of the *tdh* gene. *Microbiol Immunol.* 40, 59-65.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. y H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 178, 5636-5643.
- Oliver, D. J. 1989. *Vibrio vulnificus*, p 570-600. En M.P. Doyle (Ed.). Food borne bacterial pathogens. Merceel Dekker Inc. New YorK.
- Oliver, J.D., Wear, J.E., Thomas, M.B., Warner, M. y K. Linder. 1986. Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*, *Diagn. Microbiol Infect Dis.* 5, 99-111.
- Park, K., Iida, T., Yamaichi, Y., Oyagi, T., Yamamoto K. y T. Honda. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.* 68, 5742-5748.
- Perez, S., Rodriguez, F., Lan R. y P.R. Reeves. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J Bacteriol.* 180, 2144-2151.
- Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero, J. y R.T. Espejo. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environm Microbiol.* 62, 1323- 1328.
- Provenzano, D. 2000. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect Immunity.* 68, 1491-1497.
- Recht, M. I., Douthwaite, S. y J. D. Puglisi. 1999. Basis for prokariotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO Journal.* 18, 3133-3138.
- Reischl, U., Feldmann, K., Naumann, L., Gaugler, B.J., Ninet, B. y B. Hirschel. 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 36, 1761-1764.
- Rudner, R., White, A., Studamire, B., Liu, D., Lam, W., Samarrai M. y C. Barangan. 1993. Heterogeneity in expression of ribosomal RNA operons in *Bacillus subtilis*, abstr. H-257, p. 236. *In abstracts of the 93rd General Meeting of the american society for Microbiology 1993.* American society for microbiology, Washington, D:C.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P, Lafay, B., Bouseemart, O., Gauthier, M. y R. Christen. 1994. Phylogenetic analysis and assesment of the genera *Vibrio*,

Photobacterium, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 44, 416-426.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sapag, A., Vartikar, J. y D. Draper. 1990. Dissection of the 16S rRNA binding site for ribosomal protein S4. *Biochim Biophys Acta.* 1050, 34-37.
- Sechi, L.A., Dupre I., Deriu, A., Fadda, G. y S. Zanetti. 2000. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. *J Appl Microbiol.* 88, 475-481.
- Shapiro, RL, Altekruze, S., Hutwagner, L, Bishop, R, Wilson, S, Ray, B, Thompson, S., Tauxe, RV. y Griffin. 1998. The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the U.E., 1988-1996. *Vibrio Working Group. J infect Dis.* 178, 752-759.
- Snyder, L. y W. Champeness. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria*. American Society for Microbiology Press, Washinton D. C.
- Stratz, M., Mau, M. y K. Timmis. 1996. System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients. *Mol Microbiol.* 22, 207-215.
- Suthienkul, O., Ishibashi, M., Iida, T., Nettip, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M. y T. Honda. 1995. Urease production correlates with possession of trh gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J infect Dis.* 172, 1405-1408.
- Torres, M., Ciarán, C., Balada, J.M., Squires, C. y C.L. Squieres. 2001. Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *The EMBO J.* 20, 3811-3820.
- Ueda, K, Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. y M. Kataoka. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol.* 181, 78-82.
- Venkateswaran, K., Nobuhiko, D. y H. Shigeaki. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in Shrimp. *Appl Environm Microbiol.* 64, 681-687.
- Waldor, M.K. y J.J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 272, 1910-1914.
- Wang, Y. y Z. Zhang. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology.* 146, 2845-2854.
- Wang, Y., Zhang, Z.S. y N. Ramanan. 1997. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. *J Bacteriol.* 179, 3270-3276.
- Williamson, S.J., McLaughlin, M.R. y J.H. Paul. 2001. Interaction of the ϕ HSIC Virus with Its Host: Lysogeny or Pseudolysogeny?. *Appl Environm Microbiol.* 67, 1682-1688.

- Woese, C.R., Kandler O. y M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci. USA. 87, 4576-4579.
- Wolfe, C. J. y M.G Haywood. 1993. Bioluminiscent symbionts of the caribbean flashlight fish (*Kryptophanaron alfredi*) have a single rRNA operon. Mol Mar Biol Biotechnol. 2,189-197.
- Wommack, K. E. y R.R. Colwell. 2000. Viroplankton, Viruses in aquatic ecosystems. Microbiol Mol Biol Rev. 64, 69-114.
- Yamaichi, Y., Iida, T., Park, K-S., Yamamoto, K. y T. Honda. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*, presence of two chromosomes in *Vibrio* species. Mol Microbiol. 31, 1513-1521.
- Yap, W., Zhang, H.Z. y Y. Wang. 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. J Bacteriol. 181, 5201-5209.

Microbiology (2002), **148**, 1233-1239.
© 2002 [Society for General Microbiology](#)

Research Paper

Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*

Claudia Moreno¹, Jaime Romero¹ and Romilio T. Espejo¹

Laboratorio de Bioingeniería, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago, Chile¹

Author for correspondence: Romilio T. Espejo. Tel: +56 2 6781426. Fax: +56 2 2214030. e-mail: respejo@uec.inta.uchile.cl

Analysis of the 16S rDNAs obtained from cultures of single colonies of either type collection strains or environmental strains of the genus *Vibrio* revealed the presence of polymorphism in every one of the strains examined. Polymorphism was detected by visualization of heteroduplexes produced after 16S rDNA PCR amplification, a procedure that allows for the screening of a large number of isolates. Amplified 16S rDNAs obtained from both *Vibrio parahaemolyticus* and an environmental strain were cloned. Their nucleotide sequences revealed differences of up to 2% among 16S rDNAs from the same strain. Polymorphic sites were concentrated in a recognized variable stem-loop of bacterial 16S rRNA that contained in some cases up to 83% of the total mismatches observed. Most of the substitutions present in the stem-loop region showed compensating base covariation. The accumulation of so many compensating changes in the stem-loop region implies that the divergence of the different versions of this stem-loop is relatively ancient. This divergence could be the result of either a selection process or a lateral transfer of independently evolved genes.

Keywords: marine, 16S rDNA, *rrn*

The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are [AF388386](#) (Vp23), [AF388387](#) (Vp16), [AF388388](#) (F44), [AF388389](#) (Vp27), [AF388390](#) (F6), [AF388391](#) (3d2), [AF388392](#) (3d4), [AF388393](#) (3d7) and [AF388394](#) (3d8).

- ▶ [Full Text of this Article](#)
- ▶ [Reprint \(PDF\) Version of this Article](#)
- ▶ Similar articles found in:
[Microbiology Online](#)
[PubMed](#)
- ▶ [PubMed Citation](#)
- ▶ Search Medline for articles by:
[Moreno, C.](#) || [Espejo, R. T.](#)
- ▶ Search **Agricola** for articles by:
[Moreno C.](#) || [Espejo R. T.](#)
- ▶ [Download to Citation Manager](#)

Putative pathogenic *Vibrio* strains, carrying amplicons related to pathogenic species of this genus, isolated in coastal waters of the Southern Pacific Ocean (Chile).

Claudia Moreno, Romilio T. Espejo* .

Laboratorio de Bioingeniería, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago, Chile

*Correspondence and reprints. Romilio T. Espejo, Phone: 56-2-6781426, fax 56-2-2214030, e-mail rspejo@uec.inta.uchile.cl.

Abstract - Genus *Vibrio* includes a number of bacterial species that in spite of being indigenous of the sea may infect humans with serious consequences. The pathogenic strains of this genus seem to contain particular genes associated with their virulence. To explore the presence of potential *Vibrio* pathogens in Chilean coastal waters, a search for bacteria of this genus containing genes related with virulence was conducted. Isolates of the genus *Vibrio* were grouped according to the size pattern of their 16-23S rDNA spacer regions and one isolate from each of 20 different groups was tested by PCR amplification for the presence of the following genes: *tdh*, *trh*, and the *girB* related to pathogenic *V. parahaemolyticus*; *vvhA* related to *V. vulnificus*; and *ctxA*, *tcpA* and the 16-23S rDNA spacer region related to *V. cholerae*. Only one of the isolates was positive for any of these genes; the *girB* gene related to pathogenic *V. parahaemolyticus*. To assess its potential pathogenicity, this strain was compared in detail with three type strains; *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. parahaemolyticus* (RIMD 2210086) a *tdh* positive strain of this species and *V. alginolyticus* (ATCC 17749). Comparison included molecular characterization by 16S rDNA, 16S-23S rRNA intergenic spacers, *gyrB*, DNA/DNA homology and phenotypic properties. The overall results indicated that this strain could be grouped with either *V. parahaemolyticus* or *V. alginolyticus* species according to the taxonomic criteria employed. It is able to render a product of the expected size after amplification for *girB* of *V. parahaemolyticus* and shows 100% DNA-DNA homology with the type strain of this species. However, it cannot be classified as either *V. alginolyticus* or *V. parahaemolyticus* by both 16S-23S rDNA spacer regions size pattern and sucrose fermentation, properties commonly used to distinguish between these two species.

V. parahaemolyticus/*girB*/*tdh*/ taxonomy

1. Introduction.

Bacteria of the genus *Vibrio*, which are widely distributed in coastal waters, are considered to be autochthonous organisms of marine and estuarine waters. Shellfishes hatched from these waters and consumed raw or undercooked may be harmful to the consumers due to the presence of pathogenic strains of this genus. Marine bacteria which are pathogenic for humans must combine the whole array of functions needed to survive and grow both in their marine environment and in the human intestine. The presence of potentially pathogenic vibrios constitutes a health risk which is difficult to evaluate due to the lack of methods that identify unequivocally pathogenic organisms like *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. Different studies have attempted to assess the numbers of these pathogens by measuring some phenetic properties associated with pathogenicity. In a phenotypic approach, Barbieri et al [3] concluded that their findings indicated a significant presence of potentially pathogenic *Vibrio* strains along the Adriatic Coast; they found a large number of strains producing toxins capable of causing cytoskeleton-dependent changes. In a genetic approach, Sechi et al [41] found that several *V. alginolyticus* strains rendered products when amplified for *toxR*, *toxT*, *tcpA*, or *ace*, genes related with pathogenicity in *V. cholerae*. However, these products had not the expected size and since they were not sequenced, their correspondence to the genes in virulent strains remains doubtful. In another study performed in Italy, adhesiveness and strong cytotoxicity factors were demonstrated in a significant number of *Vibrio* spp. isolated from seafood [2].

Several genes or functions have been associated with the pathogenicity of marine *Vibrio* in humans. These have been probably best demonstrated in *V. cholerae*: The pathogenicity of serotype strains O1 and O139 depends on a combination of properties, including an enterotoxin (cholera toxin [CT], *ctxA*), the ability to adhere to and colonize the small intestine (colonization factor, *tcpA*) [20] and probably several other factors [8, 13]. *V. parahaemolyticus* strains isolated from diarrhea patients produce either the thermostable direct hemolysin (TDH) or the TDH-related hemolysin (TRH) or both, properties found only in a minority of the population of free-living strains of *V. parahaemolyticus*. TDH is associated with the hemolytic activity called the Kanagawa phenomenon (KP) associated with pathogenicity [34, 39]. The possession of the *trh* gene is associated with the relatively rare urease-positive phenotype of *V. parahaemolyticus* [29, 37], making urease production a reasonably good clinical diagnostic marker for virulent (*trh*-positive) *V. parahaemolyticus* [37]. A PCR specific for the *girB* of this species has been proposed for its detection [43]. *V. vulnificus*, an opportunistic human pathogen which can cause severe septicemia [30] produces several extracellular products implicated in bacterial virulence and pathogenesis, including a cytolysin [1, 36] and other extracellular products [30]. A PCR specific for gene *vvhA* which would code a hemolysin has been proposed for detection [28].

The risk of shellfish intoxication by *Vibrio* is highly dependent of the concentration of these bacteria in seawater. The concentration of *Vibrio* species in seawater shows strong seasonal variations, probably related to water temperature. They may become undetectable (less than one per mL) in coastal waters of the North Atlantic Ocean during winter, when seawater temperature goes down to 6 °C, but may reach concentrations up to one million per mL during the summer, when temperatures reach 20 °C or higher [21, 32, 33]. Most of the studies on *Vibrio* species have been performed in temperate zones of the Atlantic Ocean with large seasonal water temperature variations, or in the Gulf coast where water temperature is particularly high throughout the year. In general, pathogenic *Vibrio* have seldom been reported in coastal waters with relatively low temperature the year around [18, 21, 32]. Accordingly, pathogenic *Vibrio* commonly found in some other regions have been seldom observed in the central and southern coast of Chile, where seawater temperature is about 12-14 °C throughout the whole year however, this does not imply, the absence of pathogenic genes. If pathogenic genes were present they may eventually combine in an array capable of conferring pathogenicity due to the high lateral gene transfer believed to occur in seawater [35, 5]. To explore the presence of pathogenicity-associated genes of *Vibrio* strains we investigated in seawater and oysters for *Vibrio* containing the following genes: *tdh* and *trh* [42], *vvhA* [28], *ctxA* [14], *tcpA* [22], *girB* of *V. parahaemolyticus* [23, 43], and the 16-23S rDNA spacer region of *V. cholerae* [9]. This study rendered only a single *Vibrio* isolate carrying a pathogenicity-associated gene. Further characterization suggested however that this isolate lacks additional properties to become virulent.

2. Materials and methods

2.1 Type and environmental strains. Bacterial strains corresponded to *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. alginolyticus* ATCC 17749, *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086, obtained directly from the respective culture collections. Environmental isolates were obtained from oysters or seawater samples collected from two points along the Chilean coast; Coloso and Horcon at latitudes 23 S and 32 S, respectively. The number of cultivable bacteria was estimated by plating in Marine agar [7]. The total number of bacteria was estimated by epifluorescence microscopy after dually staining with DAPI (final concentration 5µg/mL) and AO [final concentration 1 mg/mL] as described Kuwae and Hosokawa [25]. For isolation from water, the samples were filtered through Whatman no.1 filter paper and the bacteria were subsequently collected in a 0.4 µm pore-size membrane (Millipore). The bacteria collected in the membrane were then resuspended by vortexing in 2 mL of alkaline peptone water (APW) and subsequently plated on TCBS containing 2% NaCl, directly or after incubation for enrichment [19]. The TCBS plates were incubated overnight at 37°C and 17°C for 16 to 18h. Single colonies were replicated in marine agar and after two or three successive colony replications cultures were obtained for further characterization. Strains isolated from oysters were obtained from oyster homogenates prepared as described Romero and Espejo, [40]. The similarity of the 16S rDNA of the different isolates was estimated by the relative migration of the heteroduplexes formed between the amplified 16S rDNAs performed as previously described [12]. Isolates containing 16S rDNAs with similarity higher than 93% were subsequently grouped according to their 16S-23S rDNA spacer regions observed after amplification as previously described [38].

2.2 PCR amplification. DNA for PCR was isolated from single bacterial colonies picked from marine agar plates, resuspended in 50 µL of TE (Tris 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH 8.0) and lysed by boiling for 15 min. The lysate was then centrifuged at 5,000 x g for 15 sec and 1.5 µL of the supernatants were directly used as templates for amplification. Amplification for different genes were performed as described: *vvhA*, 222 pb [28], *ctxA*, 563 pb [14], *tcpA*, 617 pb and *tcpAET1*, 471 pb [22], *tdh*, 382 bp (El Tor biotype) and *trh*, 460 pb [42], *gyrB*, 285 pb [43], 16S-23S rDNA spacer region for *V. cholerae* (ISR Vc), 315-310 pb [9], *gyrB*, 1200 bp [43]. Amplification of 16S rRNA gene from positions 28 to 1492 (*E. coli* numbers), using primers 27F and 1492R, and from positions 357 to 518 were performed as previously described by Lane [27] and Gerhardt [15], respectively. Amplification of 16S-23S rDNA spacer regions was as previously described [38]

2.3 Restriction analysis. The amplification product of *gyrB* (285 pb) was digested separately with 1.5 U of either restriction endonucleases *Cfo* or *EcoRI*, as indicated by the manufacturer (Gibco BRL). The digestion was for 1 h at 37°C and the resulting fragments were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis.

2.4 DNA homology. Extraction of DNA was performed with 400 mL of a culture in the late exponential phase as previously described [11]. Purified DNA was dialyzed against saline citrate buffer [SSC; 0.15M NaCl, 0.015 M disodium citrate, pH 7.0]. The renaturation rate was measured as described by De Ley [10]. For this purpose DNA was passed repeatedly through a syringe with a narrow needle until the size of the fragments, estimated by agarose gel electrophoresis, was smaller than 20 kbp. DNA concentration was then adjusted to an absorbency of 2.0 at 260 nm. Renaturation rates were measured in a Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System (Germany) as described by Huss [16] using 2XSSC as blank. Reassociation was measured at 72 °C, following the Absorbance at 260 nm every 15 sec over 40 min. The renaturation rates were determined by the rate of decrease of Absorbance (v), and the degree of binding (%D) (similarity) was calculated according to the formula given by De Ley et al. [10]: $%D = 100X (4v_M - v_A - v_B) / 2 (v_A \times v_B)$.

2.3 Biochemical characterization: Biochemical assays were performed as described by Collins [6]. They included growth in TCBS medium, sugar fermentations, enzymatic activity (urea hydrolysis, oxidase), salt tolerance, D-glucose-gas production, motility and swarming (marine agar 25°C), and susceptibility to O/129 vibriostatic agent (150 µg). Hemolysis on human blood agar was performed as described in the Bacteriological Analytical Manual FDA [<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mi.html>]. Growth rate at different temperatures was measured by following the increase in Absorbance at 600 nm in marine broth at 46, 40, 37, 32, 27, 24, 22, 19, 17, 14 and 12 °C. delta-G was calculated as described by Koutsoumanis [24].

3. Results and Discussion.

3.1 Pathogenic genes in seawater and oysters. To search for genes associated with pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* bacteria were isolated from either oysters or water collected at two different sites of the Chilean coast, in different dates. Preliminary analysis of the seawater samples showed that they contained from the 10⁷ to 10⁸ bacteria per mL when observed by microscopy but only 2X10² to 3X10³ bacteria/mL were capable of forming colonies in marine agar and even less, 1-7 bacteria/mL in TCBS at 37 °C. Most of the bacteria recovered in TCBS were oxidase positive but only about 10% grouped within the genus *Vibrio*, according to the similarity of their 16S rDNAs with those of type strains of this genus. The similarity between 16S rDNAs was estimated by heteroduplex mobility assay (HMA). This consists of measuring the relative migration of the heteroduplexes formed after annealing the 16S rDNAs amplified from the two different species being compared [12]. Bacterial isolates with 16S rDNA showing 16S rDNA similarity with type strains of *V. parahaemolyticus* higher than 93% were considered members of the genus *Vibrio* and included in this study. Those selected were grouped according to the size pattern of the highly variable transcribed regions between the 16S and 23S rDNA genes, usually called internally transcribed regions or ITS. These patterns allow to distinguish bacteria with high resolution, in some cases even isolates of the same species [38, 4, 17]. The pattern is obtained by PCR amplification using primers for highly conserved region in the 3' end and 5' end of the 16S and 23S rDNA genes respectively, followed by electrophoresis of the product [38]. Twenty different groups were distinguished by this method and one isolate of each was analyzed for the presence of genes associated with pathogenic *Vibrio* strains. The following genes were tested according to protocols previously described: *tdh* and *trh* [42], and the *girB* related to pathogenic *V. parahaemolyticus* [43]; *vvhA* [28], related to *V. vulnificus*; *ctxA* [14], *tcpA* [22], and the 16-23S rDNA spacer region related to *V. cholerae* [9]. Only two isolates were positive by PCR of any of these genes; one for *girB* of *V. parahaemolyticus* and the other for *vvhA* of *V. vulnificus*. However, the product obtained after amplification of *vvhA* showed electrophoretic migration very different to the expected product and could be considered negative. These results suggested that although the presence of genes related to pathogenicity seemed scarce there were isolates that could correspond to species considered pathogenic for humans. The isolate positive for *girB*, called C1, was studied in further detail to assess its actual relation with pathogenic strains of *V. parahaemolyticus*. For this object, its phenotype and genotype were compared with those of *V. parahaemolyticus* type strain ATCC 17802, *V. alginolyticus* type strain ATCC 17749 and the *V. parahaemolyticus* strain RIMD 2210086. This last strain was included because the *V. parahaemolyticus* strain ATCC 17802 is negative for the pathogenicity related gene *tdh* [T. Honda, personal communication and this study].

Phylogenetic characterization of isolate C1. The product obtained after amplification for *girB* of isolate C1 DNA was indistinguishable by size from that of *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), see figure 1. It was also indistinguishable by heteroduplex mobility assay (HMA) that estimates the degree of sequence dissimilarity (results not shown). However, it seemed to differ slightly in sequence from the product of *V.*

parahaemolyticus because that of C1 did not contain restriction sites for *Cfo* and *EcoRI*, both present in the product of *V. parahaemolyticus* (results not shown). To assess the homology in *girB* a larger region of this gene, 1.2 kb instead of the 0.285 kb fragment described above, was amplified from C1 and compared with that obtained from the other three reference strains. The similarity, estimated by the relative migration of the heteroduplexes (results not shown), indicated that C1 was more closely related to *V. alginolyticus* than to *V. parahaemolyticus*. The estimated dissimilarity values were 3% for *V. parahaemolyticus* ATCC, 3% for *V. parahaemolyticus* RIMD, and 1% for *V. alginolyticus*. Further characterization, determining the size pattern of the highly variable ITS regions [4, 31], showed the apparent presence in isolate C1 of ITS contained in either *V. parahaemolyticus* or *V. alginolyticus* (see figure 2). The apparent presence of ITS from both species in a single isolate is not surprising. *V. parahaemolyticus* apparently contain nine copies of 16S rDNA [31, 43] and probably at least nine operons, each with its respective ITS. Occurrence of lateral transfer of ribosomal operons between these closely related species would generate strains containing mixtures of ITS, as described for *V. cholerae* [26]. Phylogenetic characterization was ended by determination of total DNA homology, comparing reassociation rates of mixtures of DNAs according to De Ley [10]. The values obtained were 70% for *V. alginolyticus* and 104% for *V. parahaemolyticus* ATCC. According to this last values, isolate C1 should correspond to a *V. parahaemolyticus* species rather than to *V. alginolyticus*.

Pathogenicity related properties in isolate C1. The presence of different genetic and phenotypic characteristics that have been related to pathogenicity of *V. parahaemolyticus* was determined in isolate C1. Some of these properties are shown in Table I. C1 was negative for both the gene *tdh* and the urease activity, two of the most generally accepted properties related to virulence. However none of these properties seem to be absolutely required for pathogenicity: *V. parahaemolyticus* ATCC lacks *tdh* [T. Honda, personal communication and this work, results not shown], and *V. parahaemolyticus* RIMD lacks urease activity but both show β hemolytic activity. Isolate C1 showed however other properties related to pathogenicity: it grew in TCBS at 37 °C and showed hemolysis in blood agar, although to a lesser extent than *V. parahaemolyticus* ATCC or *V. parahaemolyticus* RIMD. Growth at different temperature indicated no major differences of isolate C1 with *V. parahaemolyticus* ATCC and *V. parahaemolyticus* RIMD: It grew at 37° C and it could only be distinguished by a higher growth rate at lower temperatures. Calculated delta-G from the Arrhenius plot were 190 kJ/mol for isolate C1 versus 344, 266 and 232 for *V. parahaemolyticus* ATCC, *V. parahaemolyticus* RIMD and *V. alginolyticus*, respectively. Overall our results suggest that strain C1, though not a typical pathogenic *V. parahaemolyticus* strain, holds properties, like similarity to *V. parahaemolyticus*, capacity to grow in TCBS at 37 °C, and hemolytic activity that mark it as a potentially virulent strain. This strain, which is present in the Chilean coastal waters, could become virulent by acquisition of one or more virulence factors by lateral transfer.

Acknowledgements

This work was supported by grants FONDECYT 1990765 from the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile and by a scholarship to C. Moreno from the Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD). We thank O. Brunser for careful reading and editing of this manuscript.

References

1. Amaro C., Biosca E.G., Fouz B., Toranzo A.E., Garay E., Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice, *Infect. Immun.* 62 (1994) 759-763.
2. Baffone W., Pianetti A., Bruscolini F., Barbieri E., Citterio B., Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products, *Int. J. Food. Microbiol.* 54 (2000) 9-18.
3. Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere C., Katouli M., Kühn I., Möllby R., Bruscolini F., Donelli G., Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio spp.* and non-01 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2748-2753.
4. Berthier F., Ehrlich S.D., Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region, *FEMS. Microbiol. Lett.* 161(1998) 97-106.
5. Boyd E.F., Moyer K., Shi L., Waldor M., Infectious CTX ϕ and vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: Evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*, *Infec. Immun.* 68 (2000) 1507-1513.
6. Collins C.H., Lyne P., *Microbiological Methods* 6ed, Butterworth & Co (ed) Ltd, 1989.
7. Collins C., Lyne P., Grange J., *Vibrios, aeromonas and plesiomonas*, In *Microbiological Methods Sixth Edition*, Butterworth-Heinemann, 1991, pp. 250-258.
8. Chakraborty S., Mukhopadhyay K., Bhadra K., Ghosh N., Mitra R., Shimada T., Yamasaki S., Faruque M., Takeda Y., Colwell R., Nair B., Virulence Genes in environmental strain of *Vibrio cholerae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4022-4028.
9. Chun J., Huq A., Colwell R.R., Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. cholerae* and *Vibrio mimicus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2202-2208.
10. De Ley J., Cattoir H., Reynaerts A., The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates, *Eur. J. Biochem.* 12 (1970) 133-142.
11. Doore D., Preparation of genomic DNA, Section I. Short Protocols in Molecular Biology 2^{da} Edition, USA, 1992, pp. 2-4.
12. Espejo R., Feijóo C., Romero J., Vásquez M., PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity, *Microbiology.* 144 (1998) 1611-1617
13. Faruque M., Albert M., Mekalanos J., Epidemiology, genetics, and Ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*, *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 62 (1998) 1301-1314.
14. Field J., Popović P., Wachsmath K., Olsvik O., Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 strains from the Latin American cholera epidemic, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 2118-2121.
15. Gerhardt P., *Methods for General Molecular Bacteriology*, R.G. Murray, W. Wood, and Noel R. Krieg (ed), American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981, pp. 691
16. Huss V.A., Festl U., Heinz K., Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates, *System. Appl. Microbiol.* 4 (1983) 184-192.
17. Jensen M.A., Webster J.A., Straus N., Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 945-52.
18. Kaneko T., Colwell R., Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay, *J. Bacteriol.* 113 (1973) 924-32.
19. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M., Cholera, *Clin. Microbiol. Rev.* 8 (1995) 48-86.
20. Karaolis D.K., Somara S., Maneval J., Johnson J., Kaper J., A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-iv pilus and a phage receptor in cholerae bacteria, *Nature.* 399 (1999) 375-379.

21. Kaspar C.W., Tamplin M., Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 2425-2429.
22. Keasler S.P., Hall R.H., Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction, *Lancet.* 341 (1993) 1661.
23. Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S., Nishibuchi M., Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1173- 1177.
24. Koutsoumanis K., Taoukis P., Drosinos E.H., Nychas G.E., Applicability of Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO₂ packaging on the spoilage microflora of fish, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3528-3534.
25. Kuwae T., Hosokawa Y., Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: Relationship to dispersion treatment and sediment characteristics, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3407-3412.
26. Lan R., Reeves P.R., Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*, *Microbiology.* 144 (1998) 1213-1221.
27. Lane D.J., 16S/23S rRNA sequencing , *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom, 1991, pp 115-175
28. Lee J.Y., Bang B., Rhee J.H., Choi S.H., Two Stage Nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples, *J. of Food Scie.* 64 (1999) 158-162.
29. Lida T., Park K.S., Suthienkul O., Kozawa J., Yamaichi Y., Yamamoto K., Honda T., Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbiology.* 144 (1998) 2517-2523.
30. Linkous D., Oliver J.D., Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*, *FEMS. Microbiol. Lett.* 174 (1999) 207-214.
31. Maeda T., Takada N., Furushita M., Shiba T., Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*, *FEMS. Microbiol. Lett.* 192 (2000) 73-77
32. Miles D.W., Ross T., Olley J., McMeekin T.A., Development and evaluation of predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*, *Rnt. J. Food. Microbiol.* 38 (1997) 133-142
33. Motes M.L., DePaola A., Cook D.W., Veazey J.E., Hunsucker J.C., Garthright W.E., Blodgett R.J., Chirtel S.J., Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*), *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1459-1465.
34. Nishibuchi M., Kaper J., Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium, *Infect. Immunity.* 63 (1995). 2093-2099.
35. Nishibuchi M., Janda J.M., Ezaki T., The thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) of *Vibrio hollisae* is dissimilar in prevalence to and phylogenetically distant from the *tdh* genes of other vibrios: implications in the horizontal transfer of the *tdh* gene, *Microbiol. Immunol.* 40 (1996) 59-65.
36. Oliver J.D., Wear J.E., Thomas M.B., Warner M., Linder K., Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 5 (1986) 99-111.
37. Park K., Iida T., Yamaichi Y., Oyagi T., Yamamoto K., Honda T., Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5742-5748.
38. Pizarro J., Jedlicki E., Orellana O., Romero J., Espejo R.T., Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1323- 1328.
39. Raimondi F., Kao J.P., Fiorentini C., Fabbri A., Donelli G., Gasparini N., Rubino A., Fasano A., Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in vitro systems, *Infect. Immunity.* 68 (2000) 3180-3185.
40. Romero J., Espejo R.T., The prevalence of non cultivable bacteria in oysters (*Tiostrea chilensis*, Philippi 1845), *J. Shellfish. (2001) Research in press*
41. Sechi L.A., Dupre I., Deriu A., Fadda G., Zanetti. S., Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different vibrio species isolated in Sardinia, Italy, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 475-481.
42. Suthienkul O., Ishibashi M., Iida T., Nettip N., Supavej S., Eampokalap B., Makino M., Honda T., Urease production correlates with possession of *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand, *J. infect. Dis.* 172 (1995) 1405-1408.
43. Venkateswaran K., Nobuhiko D., Shigeaki H., Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in Shrimp, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 681-687.
44. Yamaichi Y., Iida T., Park K.S., Yamamoto K., Honda T., Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 1513-21.

45. Table I. Some Phenotypic properties of isolate C1

Test	Bacterial Strain			
	Vp	Vpt	Va	C1
Motility	+	+	+	+
Polar Flagellum	+	+	+	+
Growth in TCBS	+(G)	+(G)	+(Y)	+(Y/G) ^a
Oxidase	+	+	+	+
O/129, zone of inhibition	+	+	+	-
Urea hydrolysis	+	-	-	-
Growth in :				
0% NaCl	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	+	+
D-Glucose, gas production	-	-	-	-
Acid from:				
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	+	(V) ^b
Swarming (marine agar 25°C)	+	+	(V)	+
Beta Hemolysis	+	+	-	-

^a Colony Yellow or / and Green.

^b Variable result.

Vp: *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), Vpt: *V. parahaemolyticus* (RMID 2210086), C1: isolate C1, Va: *V. alginolyticus* (ATCC 17749).

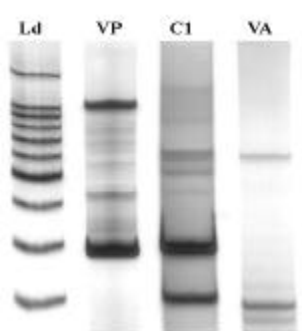


Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the product obtained after amplification for *girB* (285 bp) of DNA extracted from *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (lane VP), environmental strain C1 (lane C1) and *V. alginolyticus* ATCC 17749 (lane VA). Ld corresponds to 100 bp ladder molecular size marker.

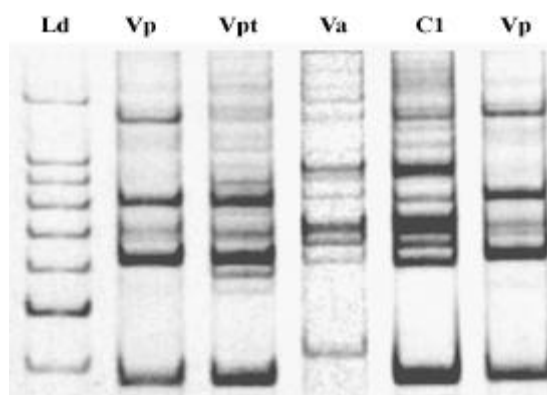


Figure 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the 16S-23S rDNA spacer regions obtained after PCR amplification of DNA extracted from *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (Vp), *V. parahaemolyticus* (RMID 2210086) (Vpt), isolate C1 (C1) and *V. alginolyticus* (17749) (Va). Ld corresponds to 100 bp ladder molecular size marker.

1
2
3 16S rRNA polymorphism in clonal bacterial populations of the genus *Vibrio*.

4
5 Claudia Moreno and Romilio T. Espejo*.

6
7 Laboratorio de Bioingeniería, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile,
8 Santiago, Chile
9

10 *Corresponding author. Romilio T. Espejo, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad
11 de Chile, Macul 5540, Santiago, Chile. Phone: 56-2-6781426, fax 56-2-2214030, e-mail:
12 respejo@uec.inta.uchile.cl.
13

14
15 **ABSTRACT**

16
17 We have recently shown that polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of strains of the genus *Vibrio*
18 and that this is concentrated in a variable stem loop (Moreno, C., J. Romero, and R. T. Espejo. 2002. Microbiology **148**:1233-1239). This
19 polymorphism was detected by the observation of heteroduplexes produced after 16S rDNA PCR amplification. In this note we
20 demonstrate in 16S rRNA a polymorphism similar to that observed in the 16S rRNA genes, indicative of expression of the different
21 genes. Polymorphism detection was improved by amplification of a small fragment containing the variable region, instead of most of the
22 gene as previously done. Using this amplification protocol we also show the absence of polymorphism in the 16S rRNA genes of
23 particular strains of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae*.
24

25
26
27 Many organisms have multiple copies of the rRNA gene that differ in nucleotide sequence (2, 5, 14, 15-19), in some cases by
28 up to 5% (3,19). This polymorphism in 16S rDNAs is common in type collection strains and environmental strains of the genus *Vibrio*
29 (13). The polymorphism was analyzed using a method that allowed rapid testing of a large number of strains. The principle of the method
30 relies on the monitoring of heteroduplex formation after PCR amplification of the 16S rDNAs (6). When the 16S rDNA of a single
31 species containing several copies of this gene is PCR amplified, hybrids between the products of those genes differing in sequence are
32 formed. These hybrids or heteroduplexes show a retarded electrophoretic migration in polyacrylamide gels, probably due to interruptions
33 of the double helix by single stranded regions due to mismatches. In strains of *Vibrio* we recently examined, the polymorphic sites were
34 concentrated in a recognized variable stem loop of the bacterial 16S rRNA, including nucleotide sites 440-496 (*E. coli* number [1]), that
35 contained in some cases up to 83% of the total mismatches (13). Taking advantage of the fact that the polymorphism was concentrated in
36 a defined region, we improved the protocol by monitoring heteroduplexes formation after PCR amplification of a short fragment
37 containing this region, instead of almost the whole 16S rDNA as previously done.

38
39 Amplification was performed as previously described (6) except that primers 357 F and 518 R (12) were used. Gel
40 electrophoresis was performed as previously described (6) in 7% (w/v) polyacrylamide gels (7 cm long x 8 cm wide x 0.15 cm thick)
41 with Tris-borate buffer at 150 V for 0.5 hr. DNA was visualized by staining with silver nitrate (7). The PCR product was sequenced after
42 purification with Wizard as indicated by the manufacturer (Promega). Sequencing was performed with primer 357F in the Applied
43 Biosystems 310 automatic sequencer, using ABI Prism dye terminator sequencing method. RT-PCR amplification was performed in total
44 RNA, obtained with TRIZOL according to the procedure indicated by the manufacturer (GIBCO BRL), and subsequently treated with
45 Rnase-free DNase I (Boehringer Mannheim) as previously described (10) to remove any remaining DNA. Effective elimination of DNA
46 was verified by the absence of product after PCR amplification (results not shown). One microgram of this RNA was then reversibly
47 transcribed with AMV RT as described by the manufacturer (Promega) using the primer 357F. Subsequently, two microliters of the
48 reverse transcription mix were used directly as template for PCR amplification of fragment 338-518, using the same conditions and
49 reagents described above for amplification of DNA.

50
51 Figure 1 shows the products of amplification of a short fragment containing the variable region of 16S rDNA, performed with
52 primers 357 F and 518 R. As expected, the heteroduplexes observed in the strains with 16S rDNA polymorphism (*V. parahaemolyticus*,
53 *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* strain C1) are clearly resolved. *V. parahaemolyticus* strain C1 was isolated by us from seawater.
54 This figure also shows the products obtained from *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086 and *V. cholerae* IPH, the only two strains of this
55 genus examined to date that have not shown heteroduplexes after amplification. *V. parahaemolyticus*, RIMD 2210086 is a *tdh+* strain
56 obtained from the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan. *V. cholerae* is a non O1 strain obtained from the
57 Institute of Public Health, Chile. The absence of heteroduplexes in *V. cholerae* is in agreement with the lack of polymorphic site
58 concentration observed in the 16S rRNA genes of the genome sequence of the El Tor strain of this species (8).

59
60 To evaluate the expression of the polymorphic 16S rRNA gene copies, polymorphism in rRNA was explored. Expression of
61 the different 16S rRNA genes might be differentially regulated; Hirvonen et al. (9) have shown that the same inputs contribute to the
62 strength of all seven *rm* P1 promoters in *E. coli* but that the relative contributions of these inputs vary. Polymorphism in 16S rRNA was
63 explored by checking the formation of heteroduplex in the RT-PCR product of the rRNA. Figure 2 shows that a pattern indistinguishable
64 from that obtained by amplification of DNA is obtained with RNA, indicating that in 16S rRNA exists a polymorphism similar to that
65 observed in the 16S rDNA and that these genes were not differentially expressed. However, this observation does not rule out that
66 expression of different 16S rRNA genes might be differentially regulated in response to particular conditions. The possession of multiple
67 ribosomal operons has been related with growth rate response to the composition of the medium and there is some evidence suggesting
68 differential regulation of the expression of the different operons in the same genome (4, 11).

Acknowledgements.

This work was supported by grants FONDECYT 1990765 from the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Chile, and DID from the University of Chile. C. Moreno is a recipient of a scholarship from Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD).

We thank O. Brunser for corrections in the English language.

REFERENCES

1. **Brosius, J., M. L. Palmer, J. P. Kennedy, and H. F. Noller.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**:4801-4805.
2. **Cilia, V., B. Laffay, and R. Christen.** 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analysis at the species level. Mol. Biol. Evol. **13**:451-461.
3. **Clayton, R. A., G. Sutton, P. S. Hinkle, J. C. Bult, and C. Fields.** 1995. Intraspecific variation in small subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokariotic taxa. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:595-599.
4. **Codon, C., J. Philips, Z. Y. Fu, C. Squires and C. L. Squires.** 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. The EMBO J. **11**:4175-4185.
5. **Dahllof, I., H. Baillie, and S. Kjelleberg.** 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraespecies heterogeneity. Appl. Environm. Microbiol. **66**:3376-338.
6. **Espejo, R. T., C. G. Feijóo, J. Romero, and M. Vásquez.** 1998. PAGE Analysis of the Heteroduplexes formed Between PCR Amplified 16S Ribosomal RNA Genes: Estimation of Sequence Similarity and rDNA complexity. Microbiology **144**:1611-1617.
7. **Espejo, R. T., and D. Escanilla.** 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using "primer-dimer" formation as an internal control of amplification. Res Virol. **144**:243-246.
8. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. Mcdonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, and O. White.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature **406**:477-483.
9. **Hirvonen, C., A. W. Ross, C. E. Wozniak, E. Marasco, J. R. Anthony, S. E. Aiyar, V. H. Newburn, and R. L. Gourse.** 2001. Contributions of UP Elements and the Transcription Factor FIS to Expression from the Seven *rrn* P1 Promoters in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:6305-6314.
10. **Huang, Z., M. J. Fasco, and L. S. Kaminski.** 1996. Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. Bio. Techniques **20**:1012-1020.
11. **Klappenbach, J. A., J. M. Dunbar, and T. M. Schmidt.** 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **66**:1328-1333.
12. **Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England.
13. **Moreno, C., J. Romero, and R. T. Espejo.** 2002. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. Microbiology **148**:1223-1239.
14. **Reischl, U., K. Feldmann, L. Naumann, B. J. Gaugler, B. Ninet, and B. Hirschel.** 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. J Clin. Microbiol. **36**:1761-1764.
15. **Ueda, K., T. Seki, T. Kudo, T. Yoshida, and M. Kataoka.** 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. **181**:78-82.
16. **Ulrich, N., B. Engelen, A. Felske, J. Snaird, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol. **178**:5636-5643.
17. **Wang, Y., and Z. Zhang.** 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. Microbiology **146**:2845-2854.
18. **Wang, Y., Z. S. Zhang, and N. Ramanan.** 1997. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes. J. Bacteriol. **179**:3270-3276.
19. **Yap, W., H. Z. Zhang, and Y. Wang.** 1999. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. J. Bacteriol. **181**:5201-5209.

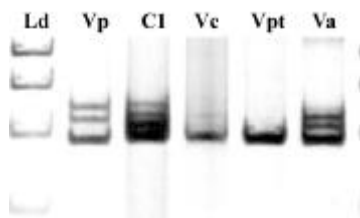
1
2
3
4
5

Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the products obtained after amplification of the 16S rDNAs fragment of 180 pb. Amplification of DNA extracted from: *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, lane Vp; environmental *V. parahaemolyticus* strain C1, lane C1; *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086, lane Vpt; *V. cholerae* IPH, lane Vc; and *V. alginolyticus* ATCC 17749, lane Va. Ld corresponds to 100 bp ladder molecular size marker.

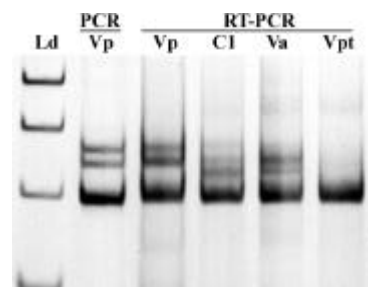


Figure 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the products obtained after RT-PCR amplification of RNA from *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* strain C1, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* RIMD 2210086, Lanes Vp, C1, Va, and Vpt, respectively. The product after PCR amplification of *V. parahaemolyticus* DNA is shown in lane PCR/Vp. Ld corresponds to 100 bp ladder molecular size marker.

6
7
8
9