

UCH-FC  
DOG - Microbiología  
9643  
C.1

**CARACTERIZACION DE LOS OPERONES RIBOSOMALES EN BACTERIAS  
MARINAS**

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

**Narjol González Escalona**

Junio, 2004



Director de Tesis: Dr. Romilio Espejo

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

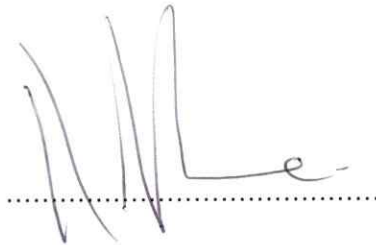
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**NARJOL GONZÁLEZ ESCALONA**

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 7 de Mayo de año 2004.

Director de Tesis:

Dr Romilio Espejo:



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Margarita Carú

Dr. Davor Cotoras

Dr. Michael Seeger



## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

El Dr. Romilio Espejo Torres, por su apoyo constante, colaboración y objetivas críticas, que junto a su motivación me permitieron realizar y llevar a buen término esta tesis.

Al pinche Jaime, por ser mi amigo y apoyarme en todo durante este tiempo, Claudia Moreno, Alicia Cabello, Paulina Uribe por aguantarme durante tanto tiempo y por sus oportunas ayudas.

A mis amigos allá en Cuba, que siempre llevaré en mi corazón y a mis amigos acá en Chile por su apoyo y confianza.

A Marcela y Jayanti, por ser parte de mi inspiración.

Al Deustcher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) por su apoyo, financiamiento y colaboración durante la realización de esta tesis que me permitieron realizar mi estudio doctoral.

Y a todos los que de una forma o de otra me apoyaron durante todo este tiempo.



## INDICE DE MATERIAS

	PAGINAS
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
Universalidad y evolución de las ISR1.	3
Representatividad de la ISR1 para el análisis de comunidades bacterianas.	4
Evolución de las ISR1 en operones repetidos de un genoma.	7
Síntesis y degradación de los diferentes tipos de 16S rRNA en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17082 <sup>T</sup> .	12
Determinación del linaje de las cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	13
Hipótesis	16
Objetivos	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Origen y cosecha de las ostras.	17



Extracción de DNA y amplificación por PCR.	17
Construcción del Dendrograma.	18
Bacterias y medio de cultivo.	18
Preparación del agua de mar artificial (AMA) y condiciones de cultivo.	19
Extracción de DNA y amplificación por PCR.	20
Análisis de los segmentos de DNA.	21
Electroforesis en campo pulsado (PFGE).	22
Amplificación por PCR y secuenciación del operón <i>toxRS</i> y los genes <i>gyrB</i> y <i>rpoD</i> .	23
Extracción y cuantificación del RNA.	23
Amplificación por RT-PCR.	24
Secuencias nucleotídicas.	24
RESULTADOS	25
1 Análisis de comunidades bacterianas de ostras mediante la amplificación por PCR de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rDNA.	25
1.1 Conservación de los sitios blanco en las secuencias de los 16S rDNAs y 23S rDNAs disponibles en las bases de datos.	25
1.2 Estimación de la fracción de poblaciones con ISR1 no amplificables en una placa de Petri con bacterias procedentes de ostras.	26
1.3 Representación de las diferentes poblaciones bacterianas en el producto de la amplificación por PCR	



del DNA extraído de la muestra completa.	29
2. Caracterización y evolución concertada en la familia de operones ribosomales repetidos en la bacteria marina <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	33
2.1 Polimorfismo y conversión génica en los en la familia de operones ribosomales repetidos en la cepa tipo de la especie ATCC17802.	33
2.1.1 Caracterización de los operones <i>rm</i> mediante amplificación por PCR.	33
2.1.2 Caracterización de los operones <i>rm</i> por electroforesis en campo pulsado (PFGE).	36
2.1.3 Polimorfismo en la región espaciadora 16S-23S rDNA de la familia de operones <i>rm</i> .	39
2.2 Síntesis y degradación de los dos tipos de 16S rRNA en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 <sup>T</sup> .	40
2.2.1 Expresión de los diferentes tipos de <i>rrs</i> en <i>V. parahaemolyticus</i> .	40
2.2.2 Degradación de los distintos 16S rRNA en estado de escasez de nutrientes.	41
2.3 Análisis del linaje de cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante la comparación de los espaciadores 16S-23S rRNA.	43
2.3.1 Genes <i>rrs</i> en las diferentes cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	43
2.3.2 Análisis de los espaciadores 16S-23S rRNA en los múltiples operones <i>rm</i> .	47



2.3.3 Estimación de la distancia evolutiva entre cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante la comparación de otros genes.	51
DISCUSIÓN	53
1. Análisis de comunidades bacterianas de ostras mediante la amplificación por PCR de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rDNA.	53
2. Caracterización y evolución concertada en la familia de operones ribosomales repetidos en la bacteria marina <i>V. parahaemolyticus</i> .	54
2.1 Polimorfismo en la familia de operones ribosomales repetidos en <i>V. parahaemolyticus</i> .	54
2.2 Conversión génica en la familia de operones ribosomales repetidos en <i>V. parahaemolyticus</i> .	58
2.2.1 Conversión en los genes <i>rrs</i> .	58
2.2.2 Conversión en los espaciadores 16S-23S rDNA.	59
2.3 Análisis del linaje de cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> mediante la comparación de sus genes 16S rRNA y los espaciadores 16S-23S rRNA.	60
2.4 Síntesis y degradación de los dos tipos de 16S rRNA en <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802 <sup>T</sup> .	62
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO1	79



## LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Propiedades de las cepas de *V. parahaemolyticus* examinadas en el presente estudio.
- TABLA 2. RNA total en escasez de nutrientes a distintas temperaturas en comparación con fase exponencial.
- TABLA 3. Tamaño y composición de tRNAs de los ISR1 de VpAQ.
- TABLA 4. Tamaño y composición de las regiones espaciadoras 16S-23S rRNA en cepas de *V. parahaemolyticus*.
- TABLA 5. Similitud de los diferentes genes en cepas de *V. parahaemolyticus* al compararlas con esos mismo genes en la cepa pandémica VpKX.
- TABLA 6. Diferencias observadas en algunas posiciones determinadas en las secuencias del operón *toxRS* de las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus*.





## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática de la organización clásica del operón ribosomal en bacterias.

FIGURA 2. Representación esquemática de genomas con 16S rDNA repetidos polimórficos o monomórficos como consecuencia de la tasa relativa de la homogenización vs la diferenciación y los posibles mecanismos que lo generan.

FIGURA 3. Diversidad bacteriana observada mediante el análisis del patrón de ISR1 obtenido al amplificar por PCR las colonias obtenidas del homogenado de ostras en condiciones de aerobiosis.

FIGURA 4. PAGE de los productos obtenidos luego de la amplificación por PCR a temperaturas crecientes de alineamiento.

FIGURA 5. Patrones de ISR1 observados luego de la amplificación del DNA extraído de toda la muestra o extraído individualmente de cada colonia presente en la muestra.

FIGURA 6. Diversidad bacteriana observada mediante el análisis del patrón de ISR1 obtenido al amplificar por PCR las colonias obtenidas del homogenado de ostras en condiciones de anaerobiosis

FIGURA 7. Diferencias en los *rrs* del tipo 1 detectada mediante la diferencia en migración electroforética de los heterodupletes formados con el *rrs* del tipo2.

FIGURA 8. Representación esquemática de la composición de los diferentes operones *rm* putativos, que fueron distinguidos en los clones obtenidos de los productos amplificados por PCR.

FIGURA 9. Separación de los fragmentos genómicos conteniendo los operones *rm* y caracterización de sus *rrs* y las regiones espaciadoras *rrs-rrl* en la cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802<sup>T</sup>.

FIGURA 10. PAGE de los productos obtenidos por amplificación mediante PCR y RT-PCR del 16S rRNA remanente de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

FIGURA 11. Polimorfismo y diferencias en secuencia de los genes *rrs* en 4 cepas *V. parahaemolyticus*.

FIGURA 12. PAGE de los productos de amplificación de las regiones espaciadoras 16S-23S rRNA en cepas de *V. parahaemolyticus*.

FIGURA 13. Secuencia nucleotídica de la región variable de los espaciadores 16S-23S 476/461/431 bp de las cepas de *V. parahaemolyticus*.

FIGURA 14. Secuencias reportadas por diferentes autores para el fragmento que incluye la parte variable del gene 16S rRNA de *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>

## ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

DNA	Ácido desoxirribonucleótido
RNA	Ácido ribonucleótido
rRNA	Ácido ribonucleótido ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Transcripción reversa
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
HMA	Ensayo de migración del heteroduplete
PFGE	Electroforesis en campo pulsado
<i>rm</i>	Operón ribosomal
<i>rrs</i>	Gene del 16S rDNA
<i>rrl</i>	Gene del 23S rDNA
<i>rrf</i>	Gene del 5S rDNA
OTU	Unidad taxonómica operacional

## RESUMEN

Esta tesis describe la caracterización de los operones *rrn* repetidos en bacterias marinas. La región ubicada entre los genes 16S rRNA y 23S rRNA, del operón ribosomal, es denominada comúnmente **ISR1** (intergenic spacer region). Esta región ha sido empleada para la identificación de bacterias, análisis de comunidades bacterianas y para estudios evolutivos. Para el análisis de estas regiones se emplea la amplificación por PCR. Sin embargo, mediante este método la observación de cada población bacteriana pudiera estar limitada por diversas causas: i) presencia, y tamaño de ISR1 y ii) que las ISR1s estén enmarcadas por regiones conservadas complementarias a los partidores empleados. Debido a dificultad de calcular el efecto de las diferentes variables, la capacidad de amplificar ISR1 en una bacteria en particular, sólo puede determinarse inequívocamente en forma experimental. En la presente tesis observamos que contrariamente a lo esperado por nosotros, que una fracción significativa de poblaciones bacterianas pudieran no dar productos de amplificación, las ISR1s pudieron ser amplificadas satisfactoriamente a partir de cada colonia presente en las muestras analizadas.

Los operones repetidos *rrn* en un genoma, se mantienen iguales o similares mediante una evolución concertada. En bacterias se postula que ésta ocurre mediante conversión génica. La evolución concertada de los operones *rrn* es diferente en las distintas regiones o genes que lo integran. Los genes 16S, 23S y 5S rRNA se mantienen casi idénticos, mientras que

las ISR1s pueden ser muy diferentes dentro de un genoma. En general, sin embargo, todas las ISR1s presentan dos o más bloques de secuencias iguales que evolucionan concertadamente. Mediante la caracterización de estas regiones se pudieron conocer durante esta tesis varios aspectos relacionados con la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus*. Se estableció que la cepa tipo de la especie ATCC 17802, que tiene *rrs* polimórficos, contiene al menos 7 operones que contienen *rrs* del tipo 1 y 3 con la secuencia del tipo 2. Este resultado conjuntamente con el análisis de sus ISR1s permitió sugerir que el mecanismo de conversión génica parece estar funcionando correctamente en esta bacteria y por ende que el polimorfismo observado en sus *rrs* repetidos podría deberse a la adquisición de un *rrs* mediante transferencia lateral. Además se determinó que los dos tipos de *rrs* encontrados eran transcripcionalmente activos y durante la degradación del 16S rRNA que ocurre en escasez de nutrientes ambos tipos eran degradados indistintamente.

La caracterización detallada de las ISR1 en los operones de diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* permitió determinar el posible linaje de las cepas estudiadas, incluyendo a la cepa responsable de la pandemia actual.

Por todos estos resultados, el desarrollo de esta tesis contribuyó a una mejor caracterización de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S rRNA, en bacterias marinas y a solucionar algunas incógnitas sobre el polimorfismo en *V. parahaemolyticus* y sobre el origen de nuevos serotipos pandémicos.

## SUMMARY

This thesis describes the characterization of the repeated *rrn* operons in marine bacteria. The region located between the 16S and 23S rRNA genes of the ribosomal operon, is commonly denominated ISR1 (Intergenic Spacer Region). This region has been used for bacteria identification, bacterial community analysis and for evolutionary studies. For the analysis of this region is commonly employed PCR amplification. By this method, however, the observation of every bacterial population may be limited by several causes: i) presence and size of the ISR1 and ii) that the ISR1 be surrounded by conserved regions complementary to the primers employed. Due to the difficulty to calculate the effect of these different variables, the ability to amplify the ISR1s in a particular bacteria, can only be determine experimentally. In the present thesis we observed that contrarily to our expectations, that a significant fraction of colonies would no yield amplification products, spacers were successfully amplified from every colony in the samples tested.

The repeated ribosomal operons in a genome are maintained identical or almost identical by concerted evolution. In bacteria this concerted evolution seems to occur by gene conversion. The concerted evolution of the *rrn* operons is different for the various regions that compose them. The 16S, 23S and 5S rRNA genes remain almost identical, while the ISR1 can be very variable in size and sequence in the genome. Generally, however, all the ISR1s present two or more identical sequence blocks that evolved in a concerted fashion. By the characterization of these regions was able to learn

several aspects regarding the marine bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. We showed that the species type strain ATCC17802<sup>T</sup>, that contains polymorphic *rrs* genes, present at least 7 operons that contains an *rrs* of the sequence type1 and 3 operons with an *rrs* of the type 2. This result together with the analysis of the ISR1s allowed suggesting that the gene conversion mechanism in this bacteria seems to function correctly and thus, the polymorphism observed in their *rrs* could have arisen as a result of lateral transfer.

Besides, we demonstrated that these 2 different *rrs* copies were transcriptionally active and that during the 16S rRNA degradation that occur in the state of nutrients deprivation, both types were degraded indistinctively.

The detailed characterization of the ISR1s in the *rrn* operons of different strains of *V. parahaemolyticus* allowed determining the possible lineage of the studied strains, including the strain responsible of the actual pandemic.

Overall, taken together all of these results, the present thesis contributed to a better characterization of the spacer regions between 16S and 23S rRNA genes, in marine bacteria and to solve some incognitos regarding the polymorphism in *V. parahaemolyticus* and about the origin of some new pandemic serotypes.

## INTRODUCCION

En el ambiente marino se encuentran numerosas bacterias, entre estas encontramos algunas que podrían ser potencialmente patógenas para los peces, moluscos y los seres humanos (Matsumoto y col., 2000; Colquhoun y col., 2002; Jores y col., 2003). Esto constituye una amenaza omnipresente, tanto para la salud humana como para la acuicultura. Esta amenaza es independiente de la contaminación humana debido a que la mayoría de estas bacterias son autóctonas del mar. Por lo que se requiere un estudio más profundo de la diversidad y ecología de estas bacterias.

Entre estas bacterias marinas las más importantes son las pertenecientes al género *Vibrio*, como: *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, entre otros (Matsumoto y col., 2000; Colquhoun y col., 2002; Jores y col., 2003). Las bacterias de este género se caracterizan por poseer varias copias de genes ribosomales repetidos en el genoma y pueden poseer de 7 hasta 11 operones (The Ribosomal RNA Operon Copy Number Database (Klappenbach y col., 2001)).

Los genes ribosomales se encuentran organizados en el genoma bacteriano formando operones y se presentan en la mayoría de las bacterias en el siguiente orden 16S-23S-5S, aunque existen algunas escasas excepciones como: *Thermus thermophilus*, *Leptospira interrogans* (Fukunaga y Mifuchi, 1989), *Borrelia* spp. (Ojaimi y col., 1994), *Wolbachia pipientis* (Bensaadi-Merchermek y col., 1995); *Rickettsia* spp. (Andersson y col., 1999) y *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997), donde los genes 16S y



23S rRNA forman operones ribosomales separados (operones 16S y 23S rDNA). Entre los genes 16S rRNA (*rrs*) y 23S rRNA (*rrl*) y los genes 23S rRNA y 5S rRNA (*rrf*), del operón ribosomal (*rrn*), se encuentran unas regiones que los separan y que se denominan comúnmente ISR (intergenic spacer region). Se denomina ISR1 a la ISR localizada entre los genes *rrs* y *rrl* e ISR2 a la ISR localizada entre los genes *rrl* y *rrf*. La ISR1 no se encuentra en las bacterias señaladas que contienen operones ribosomales con una organización no clásica.



**Fig. 1.** Representación esquemática de la organización clásica del operón ribosomal en bacterias.

La ISR1 puede encontrarse en varias copias dependiendo del número de operones ribosomales repetidos. El número de los operones ribosomales descritos en bacterias varía desde 1 hasta 12 (Fogel y col., 1999). Las ISR1s de diferentes operones pueden diferir tanto en secuencia como en tamaño, de esta forma una bacteria puede presentar varias ISR1 de diferente tamaño (Clementino y col., 2001; Cohen y col., 2001). Los tamaños varían entre 60 pb como la descrita en *Thermoproteus tenax* (Gurtler y Stanisich, 1996) a 3074 pb en *Borrelia burgdorferi* (Fraser y col., 1997). Estas regiones pueden contener desde uno a varios tRNA (Orcutt y col., 2002).

El operón ribosomal se transcribe en un solo rRNA primario que contiene todo el operón, es decir, la secuencia líder, *rrs*, la ISR1, *rrl*, la ISR2

y *rrf*. Este transcripto es posteriormente procesado para generar las diferentes especies de RNAs encontradas en los ribosomas maduros (Condon y col., 1992; Gurtler y Stanisich, 1996). ISR1 contiene secuencias conservadas que participan activamente en la maduración del transcripto primario policistrónico. Estas permiten la formación de una estructura secundaria que es reconocida por la RNasa III y RNasa P, que resuelve y separa los diferentes rRNAs (Perez y col., 1998; Itean y col., 2002). Las ISR1s también contienen otras secuencias bastante conservadas dentro del dominio Bacteria, denominadas "boxB" y "boxA" que actúan como antiterminadores y participan además en el plegamiento de los tallos implicados en el procesamiento del rRNA (Berg y col., 1989; Condon y col., 1995; Itean y col., 2002).

**Universalidad y evolución de las ISR1.** La mayoría de los trabajos donde se analizan las regiones ISRs se han concentrado en el estudio de la ISR1. Debido a la sencillez de amplificación de esta región mediante el empleo de partidores "universales" (por ser sus secuencias blanco altamente conservadas en las diversas especies de bacterias) y a su gran variabilidad entre bacterias de diferentes géneros, especies o tipos de una misma especie; ha sido preferida para la identificación, tipificación y clasificación de bacterias (Conrads y col., 2002; Perez y col., 1998), y para el análisis de comunidades bacterianas (Espejo y Romero, 1997; Garcia-Martinez y col., 1999; Gong y col., 2002; Randazzo y col., 2002; Schmalenberger y col., 2001). También ha sido utilizada para estudios evolutivos (Lan y Reeves, 1998; Gurtler, 1999). Sin embargo, todas estas aplicaciones aún requieren

de una mayor comprensión de la función de las ISRs, principalmente ISR1, su universalidad y su evolución. Se desconocen dos puntos importantes; si las condiciones comúnmente utilizadas para observar las ISR1s entregan un cuadro completo de la comunidad y cómo interpretar la diferencia o similitud entre las ISR1s de dos cepas. Para este último punto es necesario conocer más sobre la evolución de estas regiones.

**Representatividad de las ISR1 para el análisis de comunidades bacterianas.** En general el análisis de las comunidades bacterianas por ISR1 se realiza amplificando esta región mediante PCR. La representación de las diferentes comunidades por los amplificados obtenidos depende entre otras cosas, de la proporción de bacterias que rinda un producto por PCR. Si la abundancia de poblaciones bacterianas con ISR1 no amplificables mediante PCR es alta, la representación real de la diversidad bacteriana en una muestra pudiera verse limitada severamente. La obtención de producto de PCR puede verse afectada por varias razones entre estas se destacan al menos 3: a) ausencia de ISR1, b) ISR1 de tamaños demasiado largos como para ser amplificadas eficientemente, y c) ISR1 enmarcadas por regiones no exactamente complementarias a los partidores empleados. La ausencia de ISR1 en algunas bacterias fue comentada anteriormente. En algunas especies bacterianas, la ISR1 es de tamaños mayores a 1500 pb y su amplificación es ineficiente empleando las *Taq* polimerasas que se emplean comúnmente en el PCR. Sin embargo la presencia de bacterias con ISR1 de tamaños grandes es muy escasa; entre los 2612 ISR1s (ISR1) presentes en la base de datos de ISR1s (RISSC), solamente 19 son mayores de 1.4 kpb

(<http://ulises.umh.es/RISSC/>). Por las razones expuestas la causa más probable del fallo en la amplificación de las ISR1 es probablemente la falta de suficiente complementariedad entre los partidores y sus regiones blancos.

Mediante el análisis de las secuencias blanco para los partidores en aquellas especies bacterianas o clones ambientales para los cuales se conocen las secuencias de los genes 16S rRNA y 23S rRNA, se puede estimar la fracción bacteriana que pudiera no observarse mediante este método. Los partidores más comúnmente utilizados para la amplificación de las ISR1 son aquellos descritos por Jensen y col. (1993). El partidador ubicado en el gene 16S rRNA, fue diseñado a partir de una región altamente conservada en un gran número de genes 16S rRNA. Sin embargo, el partidador reverso fue seleccionado examinando solamente 5 secuencias 23S rDNA bacterianas y 4 de cloroplastos de plantas. La secuencia blanco de este partidador reverso se encuentra menos conservada entre los genes 23S rRNA. Gurtler y Stanisich (1996) realizaron una revisión de estas secuencias en 21 especies que representan 8 géneros, y mostraron que 8 de ellas contenían al menos 1 mal apareamiento dentro de las 5 bases cercanas al extremo 3' del partidador. La amplificación dependerá del grado de complementariedad entre el partidador y la secuencia blanco pero es muy difícil distinguir el número y posiciones de los sitios no apareados que la afectarían. El efecto de los sitios mal apareados sobre la temperatura de fusión es difícil de calcular pues varía según el tipo de bases opuestas y la secuencia adyacente (Tijssen, 1993). Si los sitios no apareados se concentran hacia el extremo 3' del partidador, se desestabilizaría la unión de la

polimerasa a éste extremo impidiéndose el paso posterior de extensión (Tijssen, 1993). En un análisis reciente sobre la microbiota presentes en ostras (Romero y col., 2002), se observó la predominancia de una bacteria relacionada con *Arcobacter spp.* mediante la amplificación del gene 16S rRNA empleando partidores "universales". Sin embargo, fue imposible detectar esta bacteria mediante la amplificación de la ISR1. Esta discrepancia se debió posiblemente por la presencia de una zona blanco no efectiva para el partidore reverso en el gene 23S rRNA.

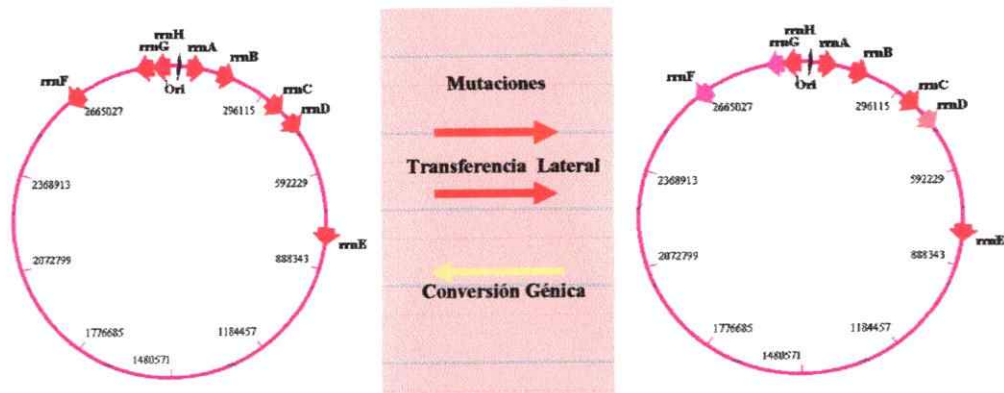
En su conjunto, todas estas observaciones sugieren que se estaría perdiendo una fracción bastante importante de especies bacterianas en los análisis de comunidades basadas en la amplificación mediante PCR empleando el método descrito por Jensen y col. (1993). Sin embargo, estas estimaciones consideran exclusivamente aquellos grupos bacterianos con secuencias rRNA reportadas hasta la fecha, y excluyen a los grupos bacterianos aún por descubrir, que pueden conformar un grupo varios órdenes de magnitud más numeroso (Amann y col., 1995).

En conclusión, la capacidad de observar ISR1 en una bacteria en particular sólo puede determinarse inequívocamente en forma experimental. En esta tesis, hemos empleado un acercamiento empírico para estimar la fracción de una comunidad bacteriana que pudiera perderse cuando una muestra es analizada por amplificación de la ISR1 por PCR, empleando los partidores y el método descrito por Jensen y col. (1993). Con este objeto, medimos la frecuencia de colonias con ISR1 amplificables en una muestra en particular. Esta muestra consistió en placas de agar sólido conteniendo

alrededor de 50 colonias derivadas de homogenados de ostras. Analizamos cada colonia por la presencia de ISR1 amplificables y la correspondencia de su patrón de ISR1 con el patrón de ISR1 obtenido luego de amplificación por PCR del DNA total de la muestra, como se realiza usualmente en este tipo de análisis.

**Evolución de las ISR1 en operones repetidos de un genoma.** La familia de genes repetidos ribosomales *rrs* se mantienen casi idénticos entre ortólogos de la misma especie o clon, y muestran un nivel de divergencia con sus ortólogos en otras especies (Elder, Jr. y Turner, 1995; Liao, 1999; Liao, 2000). Estas observaciones indican que existe una evolución concertada en los miembros de esta familia multigénica (Gurtler y Mayall, 1999; Liao, 2000). A pesar de evolucionar de manera concertada, en estos genes también existe, al igual que en todos los demás genes, una presión hacia la diferenciación, ocasionada por mutaciones, rearrreglos cromosomales y por la adquisición de genes por transferencia lateral (Arber, 2000). Los mecanismos mediante los que ocurre esta homogenización o evolución concertada entre los genes *rrs* multicopias no se encuentran elucidados hasta la fecha. Sin embargo, se cree que en los procariontes ocurre a través de conversión génica (Liao, 2000), que es un proceso en que un segmento de DNA es convertido a la secuencia presente en otro segmento o al menos parece ocurrir de este modo. Este proceso pudiera ocasionarse por un tipo de recombinación "no-recíproca" entre los operones *rm* o parte de ellos (Lan y Reeves, 1998). En esta forma se ha explicado la propagación de un operón *rm* a otro de un sitio *Bgl*I en el clon de la séptima

pandemia de *V. cholerae* (Lan y Reeves, 1998). Sin la existencia de la evolución concertada, las mutaciones irían acumulándose en los genes rRNA individualmente a un nivel similar al que se acumulan entre especies (Liao, 2000). En la evolución de los *rm* repetidos existen por lo tanto dos presiones, una hacia a la diferenciación y otra hacia la homogeneización. Dependiendo de cual sea más intensa, el resultado final será genes repetidos idénticos si la homogeneización es mayor, o bien genes repetidos polimórficos si la presión hacia la diferenciación es mayor.



**Fig. 2.** Representación esquemática de genomas con 16S rDNA repetidos polimórficos o monomórficos como consecuencia de la tasa relativa de la homogeneización vs la diferenciación y los posibles mecanismos que lo generan.

En la familia de operones repetidos *rm*, la aparente evolución concertada es diferente para las distintas regiones o genes que lo integran. A pesar que en la mayoría de los casos el mismo *rrs* se mantiene en todos los operones repetidos, las regiones espaciadoras (ISR) pueden ser diferentes. Las ISR1s de un genoma conteniendo operones con *rrs* idénticos pueden ser iguales o distinguirse en tamaño y secuencia. Sin embargo,

todos las ISR1s de un mismo genoma pueden presentar dos o más bloques de secuencias iguales, o sea que muestran una evolución concertada (Anton y col., 1998; Gurtler, 1999; Conrads y col., 2002). Dos de estos bloques se ubican en los extremos 5' y 3' de las ISR1s y su función pudiera relacionarse con en la "maduración" del transcrito ribosomal primario. Entender las razones por qué la evolución concertada es diferente en dos regiones adyacentes podría contribuir a la comprensión de la evolución de los *rm*. Al igual que los *rrs*, los bloques iguales de las ISR1 sufren evolución concertada dentro de la especie pero se van diferenciando entre especies, haciéndose más divergente entre mayor sea la distancia evolutiva (Gurtler, 1999).

En el caso de la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus* la cuál contiene numerosas copias de operones *rm*, también se puede apreciar este tipo de eventos. Recientemente, el genoma secuenciado de una cepa de esta especie, RIMD2210633 (VpKX), ha sido publicado (Makino y col., 2003). Su genoma consiste en 2 cromosomas circulares que contienen 11 copias de operones *rm*, 10 en el cromosoma 1 y uno en el cromosoma 2. Esta cepa muestra genes *rrs* idénticos en todos sus 11 operones ribosomales (Makino y col., 2003), sin embargo la mayoría de las cepas del género *Vibrio* muestran pequeñas pero detectables diferencias entre estos genes, incluyendo la cepa tipo de la especie ATCC 17802<sup>T</sup> (VpD) (Moreno y col., 2002). Esta cepa contiene genes *rrs* repetidos que son polimórficos y pueden ser distinguidos en dos tipos, que difieren en 11 sitios que conforman una horquilla del 16S rRNA, desde los nucleótidos 440-496



(numeración de *Escherichia coli*). Este polimorfismo en sus *rrs* puede ser observado mediante la formación de heterodupletes luego de amplificar por PCR los genes 16S rDNA de esta cepa (Moreno y col., 2002). Para mantener esta estructura cada cambio de un sitio va acompañado por otro en el bloque que conforma la hebra complementaria de la horquilla. La acumulación de tantas diferencias acompañadas por cambios compensatorios sugiere que la divergencia de los dos tipos de *rrs*, encontrados en VpD, es relativamente antigua y que una de estas secuencias probablemente evolucionó en otra cepa y fue adquirida por transferencia lateral. Una de las secuencias pudiera corresponder al *rrs* en un solo operón que recombinó con el DNA entrante pero también pudiera corresponder a un *rrs* presente en varios operones *rm*, en el caso de que esta secuencia halla sido propagada a otros *rrs*, a través de eventos de conversión génica. Desconocemos si un hecho similar al observado en los *rrs* se da en las ISR1 de esta cepa (VpD), por lo que una comparación entre sus ISR1s podrá ayudar a comprender la forma en que ocurre la evolución concertada y a entender los fenómenos que determinan poli y monomorfismo.

Para explorar el número de operones que contienen cada uno de los tipos de *rrs* y las posibles señales de eventos de conversión génica, caracterizamos los diferentes operones *rm* en VpD mediante clonamiento y secuenciación de sus diferentes *rrs* conjuntamente con su ISR1 adyacente, obtenidos mediante amplificación por PCR. Los operones *rm* en cada uno de los clones fueron distinguidos y agrupados por el tamaño y secuencia del.

ISR1 que contenían (Maeda y col., 2000; Makino y col., 2003) y luego fue secuenciado el *rrs* de cada grupo. Para distinguir las potenciales quimeras que podrían formarse entre los *rrs* y los ISR1s de los diferentes operones *rm* durante la amplificación por PCR, el tipo de secuencia *rrs* fue también determinado en los operones *rm* previamente separados por electroforesis en campo pulsado (PFGE) luego de digerirse el DNA total con la enzima *I-CeuI*. La enzima de restricción *I-CeuI* reconoce y corta en una secuencia de 19 pb presente en el gene 23S rRNA de los operones *rm* de la mayoría de las proteobacterias (Liu y Sanderson, 1995), incluyendo a *V. parahaemolyticus* (Makino y col., 2003). Mediante ambos análisis observamos que al menos existían 7 operones *rm* conteniendo *rrs* con la secuencia tipo 1 y 3 operones conteniendo la secuencia del tipo 2, la presencia de más de un operón de cada tipo, indicaría que una de las secuencias se ha propagado a los otros operones, probablemente por conversión génica. Además al comparar las secuencias de los diferentes operones se observaron otros rastros de conversión génica entre los operones *rm*, como la presencia de las mismas mutaciones en el mismo sitio en algunos de los operones y la conservación de bloques de secuencias en las ISR1 altamente variables. El conjunto de todas estas observaciones sugiere que un *rrs* con una secuencia bastante similar fue adquirido por transferencia lateral por la cepa analizada y posteriormente propagada a los otros operones *rm* mediante conversión génica. Estas observaciones tienen además una implicancia significativa en el empleo del gene 16S rRNA para los estudios filogenéticos porque para algunos la diferencia entre los *rrs* del

tipo1 y el tipo2 indicarían que pertenecen a diferentes especies y sugiere una revisión en la designación de la cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus*.

**Síntesis y degradación de los diferentes tipos de 16S rRNA en *V. parahaemolyticus* ATCC17082<sup>T</sup>.** Como se menciona más arriba, esta cepa contiene dos tipos de secuencias en los *rrs*, denominadas tipo 1 y 2 (Moreno y col., 2002). También se observó que la secuencia del tipo 2 se encuentra en al menos 3 operones *rm* y la del tipo 1 en 7 u 8. La expresión de las diferentes copias de los genes 16S rRNA pudieran ser reguladas diferencialmente. De acuerdo a Hirvonen y col. (2001) un mismo estímulo puede activar los promotores P1 presentes en todos los operones *rm* en *E. coli*, pero la contribución relativa de esta activación por un estímulo en particular puede variar. Debido a estas consideraciones nos planteamos la posibilidad de explorar si estos dos tipos diferentes de *rrs* en VpD, se estaban expresando.

La mayoría de los estudios de metabolismo bacteriano ha sido realizado en células en estado exponencial y poco se sabe de cómo se comporta en ambientes naturales (Kalpaxis y col., 1998). La adaptación a estados de no crecimiento, observables en bacterias sobreviviendo en ambientes oligotróficos, requiere de un gran ajuste fisiológico (Kramer y Singleton, 1992; Kalpaxis y col., 1998). Se ha observado que cuando la célula alcanza un estadio de escasez de fuentes de carbono, ocurre una rápida degradación de los ribosomas y por lo tanto de sus rRNAs, esencial para su sobrevivencia (Davis y col., 1986; Matin y col., 1989). Sin embargo

un nivel crítico de ribosomas deben permanecer funcionales, de lo contrario la célula no podría realizar algunos procesos, necesarios durante escasez de nutrientes y especialmente de retornar a condiciones de crecimiento rápido (Kalpaxis y col., 1998). En estudios de sobrevivencia de *V. cholerae* en agua de mar artificial mantenidas a diferentes temperaturas se ha observado que a 15°C, las células pasan a un estado especial de escasez de nutrientes y a 4°C pasan a un estadio de viable no cultivable (VBNC) (Pruzzo y col., 2003). En ambos pasos, los ajustes metabólicos deben ser bastante bruscos. Una situación de este tipo atraviesa *V. parahaemolyticus* al ser liberado al agua desde el hospedero donde crecía. Por estas razones, nos propusimos explorar si la degradación de los dos tipos de rRNAs en VpD ocurría de manera selectiva en situaciones de escasez de nutrientes.

**Determinación del linaje de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.** *V. parahaemolyticus* es una bacteria cuyo hábitat natural son las aguas costeras y es una de las mayores causas de gastroenteritis asociada al consumo de alimentos marinos, ya sean crudos o mal cocinados (Iida y col., 1998; Tagomori y col., 2002; DePaola y col., 2003). La mayoría de los aislados clínicos son Kanagawa positivo (producen una  $\beta$ -hemólisis en un tipo especial de Agar sangre- Agar Wagatsuma) y presentan una hemolisina termoestable denominada TDH (Okuda y col., 1997a; Wong y Wang, 2004). A diferencia de *V. cholerae*, donde solamente dos serotipos, serotipo O1 y O139, han sido implicados en las pandemias de cólera hasta la fecha; la gastroenteritis provocada por *V. parahaemolyticus* puede ser ocasionada por varios serogrupos. Hasta la fecha han sido descritas al

menos 75 combinaciones diferentes de serotipos O y K (Bhuiyan y col., 2002). Desde 1996, la mayoría de los aislados clínicos de *V. parahaemolyticus* se han originado aparentemente de un mismo clon pandémico. Estos aislados se han encontrado en muchas de las infecciones reportadas en la India, Rusia, Sudeste Asiático, Japón y Norte América (Chiou y col., 2000; DePaola y col., 2000). Aislados del serovar O3:K6 y otros que han aparecido recientemente (O4:K68, O1:K25, O1:K41 y O4:K12) todos obtenidos a partir de 1996 han sido considerados como un mismo clon (Okuda y col., 1997b; Okuda y Nishibuchi, 1998; Laohaprerthisan y col., 2003). La naturaleza clonal fue supuesta debido a la gran cantidad de propiedades compartidas entre estos aislados, ausentes en la mayoría de los aislados O3:K6 obtenidos antes de 1996. Estas propiedades incluyen: (i) presencia del gene *tdh* y ausencia de los genes *trh* y *ure* (Okuda y Nishibuchi, 1998), (ii) patrones casi idénticos por PCR empleando partidores que se unen arbitrariamente (AP-PCR) (Okuda y Nishibuchi, 1998), y por PFGE (Arakawa y col., 1999), (iii) presencia de una secuencia única en el operón *toxRS* (Matsumoto y col., 2000), y (iv) presencia de un fago filamentoso, f237 (Nasu y col., 2000), con un marco abierto de lectura único (ORF 8) (Iida y col., 2001; Osawa y col., 2002). Algunas de las serovariantes aisladas más recientemente, carecen de algunas de estas propiedades (Laohaprerthisan y col., 2003).

Como se menciona más arriba esta bacteria contiene un número elevado de operones *rnn* y en la cepa secuenciada RIMD 2210633 (VpKX) todos sus genes *rns* son idénticos (Makino y col., 2003). VpD presenta genes

*rrs* polimórficos y es en cambio una cepa no O3:K6 aislada en 1951. Los *Vibrios* son bacterias que viven en agua de mar y por lo tanto se encuentran sometidas a un alto nivel de transferencia de genes por transducción (Jiang y Paul, 1998). Por ejemplo, cepas O3:K6 de *V. parahaemolyticus* se encuentran asociadas a un fago filamentoso capaz de integrarse en el cromosoma del huésped (Nasu y col., 2000; Iida y col., 2002). Este tipo de fagos pudiera facilitar la transferencia lateral de genes *rrs* de especies relacionadas muy cercanamente. Debido a que el polimorfismo en los genes *rrs* parece prevalecer entre las especies de *Vibrio* (Moreno y col., 2002), la emergencia de cepas como la VpKX que carecen de polimorfismo en sus genes *rrs* repetidos, pudiera deberse a un aislamiento ecológico prolongado o a la selección de una secuencia *rrs* en particular por razones que se desconocen. En la presente tesis describimos la caracterización y comparación de los operones *rrn* en 11 aislados pandémicos incluyendo VpKX y en 3 no-pandémicos; VpD, la cepa tipo de la especie, VpAQ, un aislado O3:K6 Kanagawa negativo obtenido en 1991 (Tagomori y col., 2002), y Vpl, un aislado O4:K12 Kanagawa positivo obtenido en 1968 (M. Yoh, RIMD, Osaka University, comunicación personal). El análisis comparativo de estas cepas permitió llegar a conclusiones importantes en relación a la filogenia de las cepas pandémicas.

**HIPÓTESIS:**

Una interpretación más adecuada de los resultados de diversidad bacteriana basados en el análisis de los operones ribosomales en bacterias requiere un mayor conocimiento. Se postula que el método de amplificación de la región espaciadora ubicada entre los genes 16S y 23S rRNA, podría no determinar todas las bacterias presentes en una muestra. Además se postula que en las bacterias de la especie *V. parahaemolyticus* la existencia del polimorfismo en sus genes 16S rRNA repetidos se debe a una ineficiencia en el mecanismo de homogenización (conversión génica).

**OBJETIVOS:**

1. Determinar empíricamente la frecuencia de bacterias con ISR1 no amplificables.
2. Caracterizar los genes 16S rRNA repetidos y sus regiones ISR1 adyacentes en la cepa tipo de *V. parahaemolyticus*.
  - 2.1 Determinar los diferentes operones ribosomales en la cepa tipo de *V. parahaemolyticus*.
  - 2.2 Determinar si son activos transcripcionalmente los dos tipos de 16S rDNA presentes en dicha cepa.
3. Comparar los ISR1 de diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* con los ISR1 de la cepa pandémica O3:K6.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Origen y cosecha de las ostras.** Los ejemplares de ostras chilenas (*Tiostrea chilensis*, Philippi 1845), fueron obtenidos en el centro de cultivo "Quihua", localizado en la latitud 40° S en la costa sur de Chile, en enero del 2002. Para la obtención de homogenizados, las ostras fueron abiertas y su cuerpo fue finamente picado y pesado. Posteriormente se les añadió un volumen igual de TE 10X (Tris 0.1M, EDTA 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8) frío estéril y la mezcla fue subsecuentemente homogenizada sumergida en un baño de hielo, empleando el homogenizador de tejidos Tissue Tearor (TM, modelo 985-370, Biospec Products Inc., WI, USA) a máxima velocidad por 3 minutos. Posteriormente se sembraron diluciones seriadas del homogeneizado en placas de Agar Marino (Difco, Sparks, MD) y las placas se incubaron a 17°C en atmósferas de aerobiosis y de anaerobiosis. Para obtener las condiciones de anaerobiosis se empleó el Kit de Merck Anaerocult C (Merck), siguiendo las instrucciones del productor. Las placas conteniendo colonias espaciadas fueron seleccionadas para realizar un plaqueo en réplica.

**Extracción de DNA y amplificación por PCR.** Una de las réplicas de las placas fue empleada para la extracción del DNA total de las bacterias presentes en la placa. Con este objeto el total de las bacterias fue resuspendido mediante extenso lavado de la superficie de la placa con 5 ml de TE 10X, 0.15M NaCl frío estéril. La otra réplica fue empleada para el



análisis independiente de cada colonia bacteriana. En este caso, cada colonia fue tomada de la placa con palillos de dientes estériles y resuspendida en 100  $\mu$ l de TE 1X, 0.15M NaCl. El DNA fue a continuación extraído de las suspensiones como se describe en Romero y col. (2002).

Tanto el DNA extraído del total de bacterias, como el DNA extraído de cada colonia fueron amplificados por PCR como se describe en Espejo y Romero (1997). Brevemente, los ISR1 fueron amplificados por PCR empleando aproximadamente 1 ng de DNA y los partidores (G1 y L1) empleando las condiciones descritas por Jensen y col. (1993), con las modificaciones siguientes: se emplearon 25 ciclos de 98°C por 1.5 min, 58°C por 1.5 min, y 72°C por 1.5 min y una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron examinados a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y teñidos con nitrato de plata (Pizarro y col., 1996).

**Construcción del Dendrograma.** Los dendrogramas fueron creados usando el programa Treecon for Windows (Van de y De Wachter, 1994). Las distancias genéticas fueron calculadas basadas en el número de ISR1 del mismo tamaño o migración compartidos entre los diferentes pares de OTUs, de acuerdo a Nei y Li (1979). El agrupamiento fue realizado mediante WPGMA.

**Bacterias y medio de cultivo.** Las cepas de *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (VpD), RIMD 2210856 (VpAQ), 2210633 (VpKX) y 2210086 (Vpl) fueron obtenidas directamente de sus respectivas colecciones de cultivo. Otras cepas bacterianas, mostradas en la Tabla 1, fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Mitsuaki Nishibuchi del Center for

Southeast Asian Studies, Kyoto University. Todas las cepas bacterianas fueron crecidas en Caldo Marino (Difco, Sparks, MD) a 37°C.

**TABLA 1. Propiedades de las cepas de *V. parahaemolyticus* examinadas en la presente tesis.**

Cepas	Serotipo	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>ure</i>	GS-PCR	ORF8	Aislado en
VpD ATCC17802	Non O3:K6	+ <sup>a</sup>	ND	ND	- <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	1951, Japan
Vpl WP-1 RIMD2210086	O4:K12 <sup>d</sup>	+ <sup>a</sup>	ND	- <sup>a, b</sup>	ND	ND	1968, Wakayama
VpAQ AQ4673 RIMD2210856	O3:K6 <sup>e</sup>	+ <sup>e</sup>	+ <sup>e</sup>	+ <sup>e, f</sup>	ND	ND	1991, Osaka Airport
VpKX KXV237 RIMD2210633	O3:K6	+ <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	+ <sup>f</sup>	ND	1996, Kansai Airport
KXV225	O3 :K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	+ <sup>b</sup>	1996, Kansai Airport
VP2	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	+ <sup>b</sup>	1998, Korea
VP47	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	+ <sup>b</sup>	1996, Calcutta
ATCCBAA238							
VP81	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	1996, Calcutta
ATCCBAA239							
97LVP2	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	+ <sup>b</sup>	1997, Laos
JKY-VP6	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	97-98, Japan
AN-5034	O4:K68	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	1998, Bangladesh
AN-8373	O3:K6	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	1998, Bangladesh
OP-424	O4:K68	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	1998, Japan
KXV737	O1:KUT	+ <sup>g</sup>	- <sup>g</sup>	ND	+ <sup>g</sup>	ND	1999, Int travel THA

GS-PCR se refiere al Group specific PCR descrito por Matsumoto y col.(2000). ND es no determinado. <sup>a</sup> T. Honda, comunicación personal; <sup>b</sup> (nuestros resultados, no mostrados); <sup>c</sup>(Myers y col., 2003); <sup>d</sup> (Myosun Yoh, RIMD, Osaka University, comunicación personal; <sup>e</sup>(Tagomori y col., 2002); <sup>f</sup>(Makino y col., 2003); <sup>g</sup> (Matsumoto y col., 2000).

**Preparación del agua de mar artificial (AMA) y condiciones de cultivo.** El estudio se realizó con la cepa ATCC de *V. parahaemolyticus* y se empleó AMA (Sea Salts, Sigma) para crear las condiciones de escasez de nutrientes, a una concentración final de 35 ppt y se elaboró de acuerdo a las

especificaciones del productor. El AMA fue esterilizada por filtración empleando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Antes de comenzar con el estudio de escasez de nutrientes, la cepa fue crecida en LB a 37°C con agitación (180 rpm) durante toda la noche. Parte de este cultivo fue inoculado en medio fresco LB, en las mismas condiciones, hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600} = 0,5$ . 20 ml proveniente de este cultivo exponencial, fue centrifugado por 5 min a 4000xg y el precipitado fue lavado dos veces con AMA y luego resuspendido en AMA hasta una  $\text{DO}_{600} = 0,25$  (aprox.  $10^8$  células/ml). Esta suspensión final fue empleada para inocular 3 botellas conteniendo AMA a una concentración final de  $10^6$  células/ml. Las botellas fueron incubadas a 4°C, 15°C y 37°C por 72 horas a oscuras sin agitación. Las muestras se tomaron de cada botella a las 24h y a las 72h.

**Extracción de DNA y amplificación por PCR.** Los DNAs bacterianos fueron extraídos (Sambrook y Russell, 2000) y amplificados por PCR como ha sido descrito previamente (Espejo y Romero, 1997). Los partidores empleados en las diferentes amplificaciones fueron: Eubac27F y 1492R (DeLong, 1992) para amplificar el gene 16S rRNA; 357F y 518R (Moreno y col., 2002) para amplificar el fragmento de 161 pb que contiene la región variable del gene 16S rRNA, G1F y L1R (Jensen y col., 1993) para amplificar la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rRNA, y una combinación final de los cebadores 357F y L1R para amplificar un fragmento que contenga, tanto el 16S rDNA, como su ISR1 adyacente. Este último producto fue empleado para realizar la clonación y posterior secuenciación de los clones. Los productos de PCR fueron examinados a través de electroforesis

en geles de poliacrilamida y teñidos con nitrato de plata como ha sido descrito (Pizarro y col., 1996). Los productos del PCR fueron purificados mediante el Kit Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wi) siguiendo las instrucciones del productor. A continuación estos productos fueron clonados en el vector de clonación pGEM<sup>®</sup>T Easy Vector Systems (Promega), siguiendo el procedimiento especificado por el productor. Los plasmidios fueron obtenidos mediante extracción rápida por lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2000).

**Análisis de los segmentos de DNA.** Para el análisis, tanto del tamaño del ISR1 como del tipo de *rrs* presente en cada clon, el DNA fue diluido (1:100 vol/vol) en agua destilada estéril y se emplearon 15  $\mu$ L de esta dilución para amplificar por PCR el gene 16S rRNA o el ISR1 como se describe más arriba. El tamaño del ISR1 fue determinado mediante PAGE. La determinación del tipo de *rrs* se realizó a través del ensayo de formación de heterodupletes como ha sido descrito previamente (Espejo y col., 1998), excepto que la electroforesis fue realizada a 150V. Para la secuenciación, los plasmidios fueron purificados mediante E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I (Omega Bio-tek, Inc, Doraville, GA), siguiendo las indicaciones del productor. Los productos clonados de la cepa VpD fueron secuenciados en el Herbert Irving Comprehensive Cancer Center del Columbia Presbyterian Medical Center. Los productos clonados de las otras cepas fueron secuenciadas en el GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) en Braunschweig, Alemania. La secuenciación fue realizada en un secuenciador automático ABI 3100 Genetic Analyzer empleando el Kit de

secuenciación Big Dye Terminator Cycle Sequencing V2.0 Ready Reactions y los protocolos recomendados. Los siguientes partidores fueron empleados en la secuenciación: M13F y 518R para secuenciar la región variable de 161 pb del gene 16S rRNA, G1F y L1R para secuenciar el ISR1. Las secuencias de DNA fueron inspeccionadas individualmente y ensambladas manualmente. Las secuencias fueron alineadas y comparadas empleando el programa BioEdit (Hall, 1999).

**Electroforesis en campo pulsado (PFGE).** La preparación de los bloques de agarosa conteniendo el DNA genómico bacteriano se realizó como ha sido descrito previamente (Iida y col., 1997). El DNA embebido en los bloques de agarosa fue digerido empleando la enzima de restricción *I-CeuI* (New England Biolabs, Beverly, MA) por 16 h a 37°C, empleando 50 U/bloque. Los fragmentos resultantes de la digestión fueron separados a través de una electroforesis en campo pulsado. Esta fue realizada en un CHEF DRII System (BioRad, Hercules, CA), empleando agarosa de bajo punto de fusión (Promega, Madison, WI) al 1%, en solución tampón TBE 0.5X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA-Na, pH 8.0). La duración de los pulsos de corriente, fueron con un intervalo de tiempo de 6-60s a 200V por 24 h y a una temperatura constante de 14°C. Terminada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml) por 30 min y fotografiado. Las bandas observadas fueron subsecuentemente cortadas empleando escalpelos estériles y un trozo de cada banda fue mezclado con 10 volúmenes de TBE 1X (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA-Na, pH 8.0) y luego derretido a 65°C. De cada solución resultante se tomaron 12 µl para PCR. La reacción de PCR se

realizó como se describió previamente (Espejo y Romero, 1997), excepto que solamente se emplearon 20 ciclos. Los partidores empleados para las diferentes amplificaciones fueron: 357F y 518R para amplificar el fragmento de 161 pb que contiene la región variable del gene 16S rRNA y G1F y L1R para amplificar el ISR1.

**Amplificación por PCR y secuenciación del operón *toxRS* y los genes *gyrB* y *rpoD*.** El operón *toxRS*, los genes *gyrB* y *rpoD* fueron amplificados por PCR empleando las condiciones descritas por Matsumoto y col. (2000). Los partidores empleados fueron *toxRS.1f* y *toxRS.2r* para amplificar el operón *toxRS* (Matsumoto y col., 2000), UP-2rgyrB y UP-1gyrB para amplificar el gene *gyrB* (Venkateswaran y col., 1998), y RpoDf (5'-GGATCAAATCCGCAGTCAC-3') y RpoDr (5'-CGAATCTTCGTCGTCACCGA-3') para el gene *rpoD*. Los productos de PCR fueron purificados empleando el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen para purificación de productos de PCR, siguiendo las indicaciones del productor (Qiagen, Alemania). 3 µl de cada purificación fue secuenciado como se describe más arriba, empleando los mismos partidores empleados en la amplificación por PCR.

**Extracción y cuantificación del RNA.** Para la extracción de RNA, se tomaron 10 ml de cada botella y se centrifugaron a 4000xg por 10 min. El precipitado fue resuspendido en 0,5 ml de AMA y luego se le añadió 1 ml de una solución de RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Alemania). Se volvió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante y las muestras fueron guardadas a -70°C hasta ser procesadas. La extracción de RNA se realizó

empleando el RNeasy Mini Kit (Qiagen). La lisis de las células se realizó empleando 100  $\mu$ l de Lisozima (500  $\mu$ g/ml) por 5 min a temperatura ambiente. El tratamiento con DNasa (Qiagen) se realizó por 30 min a temperatura ambiente y siguiendo las recomendaciones indicadas por el productor. Al finalizar la extracción el RNA fue eluido con 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. El RNA fue cuantificado empleando el Kit Ribogreen de Molecular Probes y un lector de microplacas como se describe previamente (Weinbauer y col., 2002). Los RNAs fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Amplificación por RT-PCR.** La reacción de RT-PCR fue realizada en dos etapas. La reacción de RT se realizó empleando el Kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), usando como partidores hexámeros randomizados. De cada cDNA resultante, se tomaron 5  $\mu$ l para ser amplificados por PCR como ha sido descrito previamente (Matsumoto y col., 2000). Para amplificar el fragmento de 161 pb que contiene la región variable del gene 16S rRNA, se emplearon los partidores: 357F y 518R (Moreno y col., 2002). Los productos de PCR fueron examinados a través de electroforesis en geles de poliacrilamida y teñidos con nitrato de plata como ha sido descrito (Pizarro y col., 1996).

**Secuencias nucleotídicas:** Las secuencias nucleotídicas fueron depositadas en el GenBank bajo los siguientes números de accesos AY298799-808, AY527386-397 y AY531062-074.

## RESULTADOS

### 1. Análisis de comunidades bacterianas de ostras mediante la amplificación por PCR de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rDNA.

#### 1.1 Conservación de los sitios blanco en las secuencias de los 16S rDNAs y 23S rDNAs disponibles en las bases de datos.

Como se describió en la introducción la principal causa del fracaso en la observación de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S rRNA al amplificarlas por PCR, parece ser la ausencia de la secuencia complementaria al partidor reverso en el 23S rDNA. Por este motivo, se exploró la conservación de los sitios blanco en las secuencias de los 16S y 23S rDNA que se encuentran actualmente disponibles en las principales bases de datos. El análisis de la mayoría de las secuencias de 23S rDNA, disponibles en la base de datos RDP II (Maidak y col., 2001), NCBI, y en las secuencias de genomas presentes en el NCBI, mostró que entre los 23S rDNA de 79 especies correspondientes a 51 géneros, el 43% contienen 2 o más sitios nucleotídicos no complementarios a la secuencia del partidor, con al menos uno de ellos localizado en las últimas 5 bases del extremo 3' del partidor (el anexo 1 muestra algunos ejemplos de estas secuencias). Se estima que una deficiencia a este nivel en la complementariedad impediría el alineamiento estable entre el partidor y su secuencia blanco. Curiosamente, a pesar de la estrecha relación filogenética, algunas bacterias del género



*Bacillus* muestran una situación especial; mientras *Bacillus subtilis* y *B. stearothermophilus* muestran un alineamiento perfecto con el partidador, otras especies del mismo género como *B. cereus*, *B. thurigiensis* y *B. mycoides* muestran 9 sitios no complementarios. Por otro lado, el sitio blanco para el partidador en el extremo 5' parece estar altamente conservado: solamente 76 entre un total de 7584 secuencias alineadas de 16S rDNA en la base de datos RDPII (Maidak y col., 2001) (1%) muestran 2 o más sitios no complementarios a la secuencia del partidador, con al menos uno de estos sitios en las últimas 5 bases del extremo 3' del partidador.

### **1.2 Estimación de la fracción de bacterias con ISR1 no amplificables en una placa de Petri con bacterias procedentes de ostras.**

Con el objeto de estimar la fracción de una comunidad bacteriana que puede pasar desapercibida al amplificar los ISR1 con la técnica descrita, se analizaron muestras especialmente elaboradas con este objeto. Estas muestras consistieron en un par de placas iguales, obtenidas por réplica de una conteniendo alrededor de 50 colonias. La placa original fue obtenida mediante la siembra de diluciones apropiadas de homogenados de ostras. Una de las placas réplica fue usada para extraer el DNA desde el total las colonias presentes en la placa, como ocurriría normalmente cuando se emplea este método para analizar una muestra dada. La otra placa fue usada para extraer el DNA de cada colonia por separado. Los DNAs

extraídos fueron posteriormente empleados para amplificar las regiones ISR1 mediante PCR de acuerdo a Jensen y col. (1993).

Al amplificar por PCR utilizando este partidor, cada una de las 61 colonias presente en la muestra rindió productos en el rango de tamaños reportados para los ISR1 (RISSC) (<http://ulises.umh.es/RISSC/>), contrariamente a lo esperado de acuerdo a la escasa universalidad observada para la secuencia del partidor reverso. El patrón de tamaños de los ISR1s observados para cada colonia permitió distinguir 22 OTUs (Operational Taxonomical Unit) entre las 61 colonias analizadas. La Fig. 3 muestra el dendrograma obtenido luego de agrupar las colonias de acuerdo a su patrón de ISR1. El patrón H fue observado en 33 colonias y constituyó el tipo prevalente observado en la muestra.

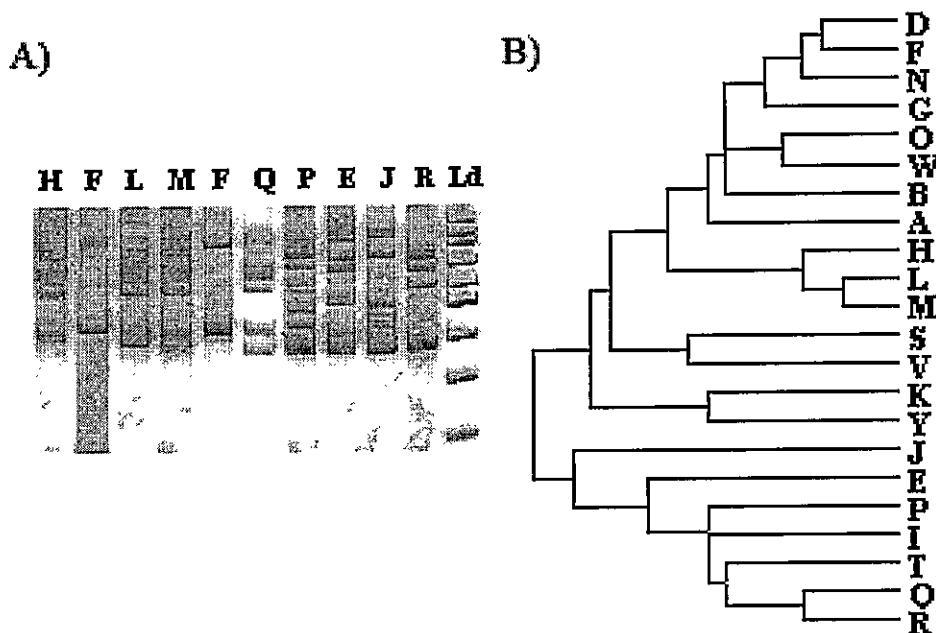
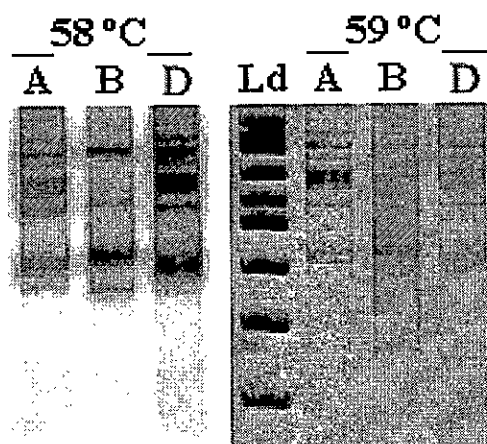


Fig. 3. Diversidad bacteriana observada mediante el análisis del patrón de ISR1 obtenido al amplificar por PCR las colonias independientemente obtenidas del homogenado de ostras en condiciones de aerobiosis. A) PAGE de los ISR1 obtenidos

luego de amplificación por PCR de algunas de las colonias más abundantes. Ld es el marcador de peso molecular de 100 pb. B) Dendrograma mostrando la similitud entre los patrones de ISR1 de cada colonia en la muestra analizada. Las letras indican el OTU al cual fueron asignadas cada colonia.

Debido a que resultó sorprendente que los ISR1 pudieran ser amplificados, con los partidores utilizados, desde cada una de las colonias observadas en la placa de Petri, se exploró la posibilidad de que la baja restricción en la etapa de alineamiento del partidore a la secuencia blanco, pudiera estar permitiendo la amplificación a pesar del mal alineamiento con alguno de los partidores empleados. Una baja restricción, permitiría la amplificación de ISR1 de operones *rrn* con un alto número de sitios mal alineados así como también la amplificación no específica de otras regiones del DNA. Para explorar esta posibilidad, se realizaron amplificaciones con una mayor restricción en la etapa de alineamiento, utilizando bacterias de colonias con patrones de ISR1 diferentes. Al ir aumentando la restricción, se esperaba una desaparición selectiva de las bandas generadas desde colonias conteniendo blancos con mal alineamiento y la permanencia de las bandas en aquellas conteniendo alineamientos correctos. Sin embargo, el resultado mostró que al aumentar la temperatura de alineamiento en solo 1 °C, se produjo una reducción uniforme en la cantidad de cada producto en todas las colonias. La Fig. 4, muestra un ejemplo de la amplificación a la temperatura de alineamiento estándar (58 °C) y a 1 °C mayor. Este resultado indicó que la restricción utilizada era casi la máxima posible y que la

observación de ISR1 en todas las colonias analizadas no se debió al empleo de una condición de baja restricción.



**Fig. 4. PAGE de los productos obtenidos luego de la amplificación por PCR a temperaturas crecientes de alineamiento. En cada carril se indica el OTU empleado para la amplificación. Ld es el marcador de peso molecular de 100 pb.**

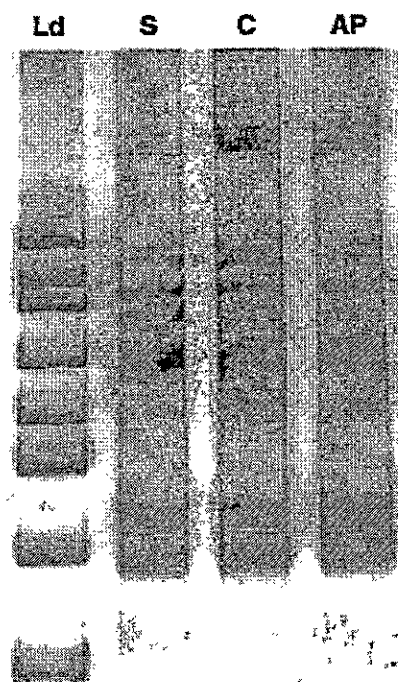
### **1.3 Representación de las diferentes poblaciones bacterianas en el producto de la amplificación por PCR del DNA extraído de la muestra completa.**

Otro factor que influye en el análisis de las comunidades bacterianas por este método es la competencia en la amplificación entre los ISR1s en bacterias diferentes. Los ISR1s con tamaño o secuencia disímiles, pueden ser amplificados con eficiencia diferente por la competencia entre las diferentes secuencias blanco. La diferente eficiencia de amplificación podría impedir la detección de productos desde DNAs con secuencias blanco apropiadas pero que por su composición o tamaño no compitieran eficientemente al ser amplificadas junto a otros DNAs. Al amplificar estas

mezclas existe entonces la posibilidad que los ISR1 de algunas colonias, que fuesen amplificadas con menor eficiencia no sean observados cuando se emplea el DNA extraído a partir de toda la muestra. Para explorar su ocurrencia en las muestras analizadas, se examinó la representación de los ISR1 obtenidos independientemente de cada colonia en el producto obtenido al amplificar la mezcla de DNAs de todas las colonias en la muestra. Específicamente, se comparó el patrón de ISR1s obtenido después de la amplificación del DNA extraído de toda la muestra, con el patrón obtenido al mezclar los productos de PCR de cada colonia (Fig. 5). Ambos patrones electroforéticos mostraron solamente diferencias sutiles (Fig. 5, carriles S y AP), sugiriendo que la amplificación de los diferentes ISR1s no fue afectada significativamente por la competencia entre DNAs. La Fig. 5 muestra además el patrón observado luego de la amplificación de una mezcla de DNA extraído de cada colonia (carril C). Casi todas las bandas electroforéticas observadas al amplificar el ISR1 de cada colonia fueron también detectadas en el producto de amplificación del DNA extraído directamente de la muestra total. Sin embargo, debido a la superposición de muchas de las bandas en este producto, no fue posible determinar si una banda en particular correspondía realmente a alguna de las bandas observadas luego de la amplificación del DNA de un grupo de colonias en particular.

Solamente para un tipo de colonia en particular (OTU F), que muestra bandas de ISR1 que no se superponen con ninguna de las de las otras colonias, se pudo observar que no estaba representada en el producto.

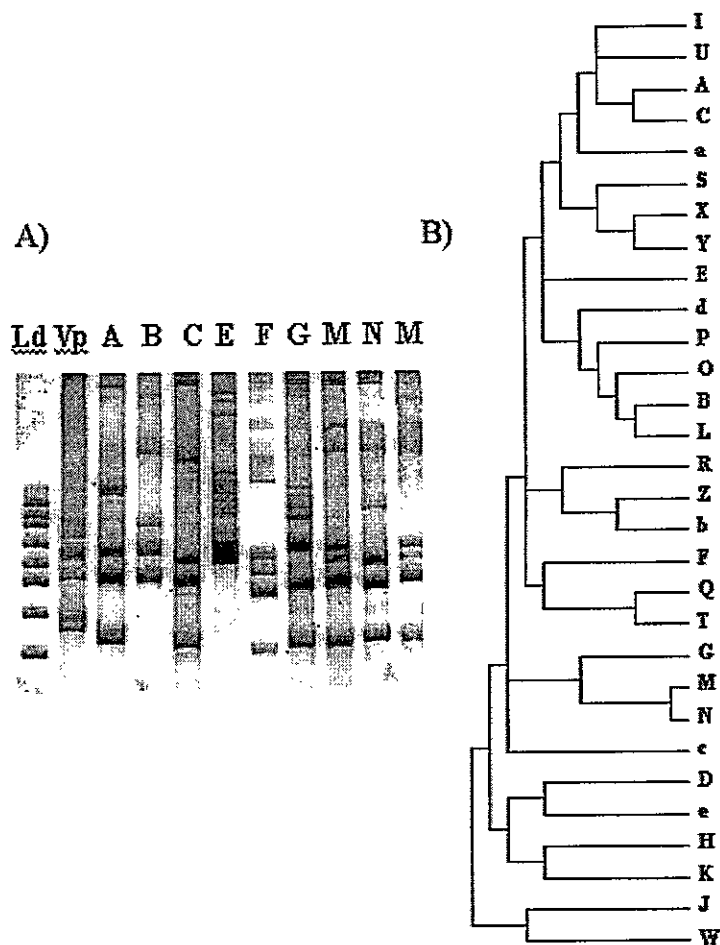
Estas colonias, representaban cerca del 10% del total (5 entre 61) y sugiere que poblaciones en porcentaje menor de 10% o menos, podrían no ser observadas en este tipo de análisis.



**Fig. 5. Patrones de ISR1 observados luego de la amplificación del DNA extraído de toda la muestra o extraído individualmente de cada colonia presente en la muestra.** El producto de PCR obtenido del DNA de toda la muestra (S), mezcla de los productos de PCR obtenidos independientemente del DNA de cada colonia presente en la muestra (AP). El carril C corresponde al producto obtenido al amplificar una mezcla de los DNAs obtenidos independientemente de cada colonia. Ld es el marcador de peso molecular de 100 pb.

Para explorar si los resultados descritos anteriormente, pudieran restringirse solo a un grupo particular de bacterias; la misma experiencia fue realizada, empleando una placa de Petri conteniendo ahora colonias crecidas en condiciones anaeróbicas. El resultado obtenido fue similar al ya descrito. Al amplificar independientemente, las 37 colonias presentes en la

muestra, cada una rindió productos de los tamaños esperados para los ISR1 (Fig. 6). En este caso, sin embargo, no existió una prevalencia de algún OTU en particular y pudieron distinguirse 30 colonias diferentes mediante sus patrones de ISR1. Los OTUs más abundantes fueron el U y el M, con 3 colonias cada uno.



**Fig. 6.** Diversidad bacteriana observada mediante el análisis del patrón de ISR1 obtenido al amplificar por PCR las colonias obtenidas independientemente del homogenado de ostras en condiciones de anaerobiosis. A) PAGE de los ISR1 obtenidos luego de amplificación por PCR de algunas de las colonias más abundantes. Ld es el marcador de peso molecular de 100 pb. B) Dendrograma mostrando la similitud entre los patrones de ISR1 de cada colonia en la muestra analizada. Las letras indican el OTU al cual fueron asignadas cada colonia. Vp: *V. parahaemolyticus*.

## **2. Caracterización y evolución concertada en la familia de operones ribosomales repetidos en la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus*.**

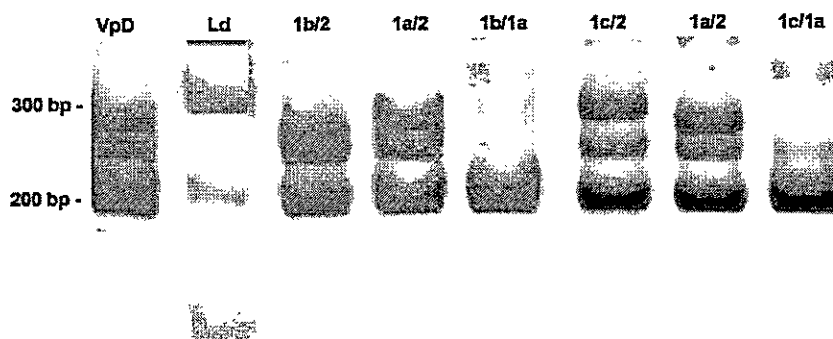
### **2.1 Polimorfismo y conversión génica en los múltiples operones ribosomales repetidos en la cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus***

#### **2.1.1 Caracterización de los operones *rm* mediante amplificación por PCR.**

La caracterización de los *rm* requirió la separación previa de los distintos operones ribosomales. Para separar los diferentes *rm*, se clonaron los productos de la amplificación por PCR conteniendo la región de interés para la distinción de los operones. Esta región contenía cerca de tres cuartos de los genes *rrs* más su ISR1 adyacente. 44 de los clones resultantes se examinaron por el tamaño del ISR1 y el tipo de *rrs*. El tamaño de los ISR1s se determinó mediante amplificación específica de esta región y posterior electroforesis, como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente se determinó el tipo de *rrs* presente en cada clon. El tipo de *rrs* se determinó por el ensayo de formación de heterodupletes. Este ensayo se basa en la formación de híbridos con migración retardada cuando los segmentos de *rrs* contienen secuencias nucleotídicas diferentes. Para este ensayo, se amplificó un fragmento de 161 pb que contiene la región variable de los *rrs*, a partir de los diferentes clones obtenidos y se probaron los productos resultantes por hibridación con fragmentos conteniendo *rrs* de tipo 1 ó 2



(Moreno y col., 2002), obtenidos de plasmidios recombinantes. En la Figura 7 se muestran los resultados de estas pruebas. De acuerdo a lo anterior la presencia de bandas con menor migración ocurre cuando el *rrs* probado es diferente al presente en el plasmidio.



**Fig. 7. Diferencias en los *rrs* del tipo 1 detectada mediante la diferencia en migración electroforética de los heterodupletes formados con el *rrs* del tipo 2.** PAGE de la hibridación de los amplicones de los diferentes clones del *rrs* de tipo 1 con los amplicones de los clones conteniendo *rrs* del tipo 1 o 2. El tipo de los amplicones *rrs* hibridados se muestra en la parte de arriba de cada carril. VpD corresponde al producto de la amplificación del DNA total de *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>. Ld corresponde a un marcador de peso molecular de 100 pb. 1<sup>a</sup>, 1b y 1c corresponden a los subtipos asignados de acuerdo a la migración electroforética de los heterodupletes formados con el amplicón del *rrs* tipo 2.

Estos ensayos además de identificar el tipo de *rrs*, permitieron distinguir 3 subtipos de secuencias en el *rrs* tipo 1, denominadas 1a, 1b y 1c. El subtipo de *rrs* 1 se detectó porque los amplicados de algunos clones formaban heterodupletes con grado diferente de migración al hibridar con el *rrs* de tipo 2, pero no formaban heterodupletes con el clon *rrs* de tipo 1. Tampoco

formaban heterodupletes al hibridar entre ellos. De acuerdo, tanto al tamaño de su ISR1 como al tipo de *rrs* los clones pudieron distinguirse en 9 grupos. Posteriormente, se secuenciaron al menos 2 clones de cada grupo. Estas secuencias permitieron identificar 10 grupos de clones; siete conteniendo el *rfs* de tipo 1 y tres el tipo 2. En la Fig. 8 se muestra un esquema del tipo de *rfs* y el ISR1 presente en los diferentes grupos. En la parte derecha se muestra esquemáticamente la secuencia de la región variable del *rfs* y los tRNAs incluidos en cada ISR1, deducidos a partir de sus secuencias. Los subtipos 1a, 1b y 1c difieren por un solo nucleótido.

## A)

```

rrs1a/ISR1-706 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'..Glu..Lys...Ala...Val...5'rrl
rrs1a/ISR1-669 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'..Glu..Lys...Val...5'rrl
rrs1c/ISR1-669 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAICT...rrs3'..Glu..Lys...Val...5'rrl
rrs2/ISR1-579 5'rrs...AGGCGGTAGTGTAAATAGCGTATTCGTT...rrs3'..Ile...Ala/Val...5'rrl
rrs1b/ISR1-542 5'rrs...AGGAGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'..Ala..Glu...5'rrl
rrs1a/ISR1-524 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'..Ile...Ala...5'rrl
rrs2/ISR1-524 5'rrs...AGGCGGTAGTGTAAATAGCGTATTCGTT...rrs3'..Ile...Ala...5'rrl
rrs1a/ISR1-476 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'..Glu...5'rrl
rrs1a/ISR1-278 5'rrs...AGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCAITT...rrs3'.....5'rrl
rrs2/ISR1-278 5'rrs...AGGCGGTAGTGTAAATAGCGTATTCGTT...rrs3'.....5'rrl

```

## B)

## Secuencias tRNA-Ala

```

tRNA-Ala 524 GCGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCCTCGGTTGATCCCGCATAGCTCCACCA
tRNA-Ala-ISR1-579 -GGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCCTCGGTTGATCCCGCATAGCTCCACCA
tRNA-Val 669 GGGCGATTAGCTCAGTGGGAGAGCAGCTGCCTTACACGCAGGAGGTCCTCGGTTGATCCCGCATAGCTCCACCA

```

## C)

## Secuencias tRNA-Ala

```

tRNA-Ala GGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCCTCGGTTGATCCCGCATAGCTCCACCA
tRNA-Ala-ISR1-542 -GGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCCTCGGTTGATCCCGCATAGCTCCACCA

```

Fig. 8. Representación esquemática de la composición de los diferentes operones *rms* putativos, que fueron distinguidos en los clones obtenidos de los productos amplificados por PCR. Los nucleótidos ubicados en los sitios polimórficos se muestran en letra negra. A) Cada uno de los 10 operones *rms* putativos designados por el tipo de *rfs* y el tamaño de su ISR1 a continuación en pb (en la primera columna). El esquema muestra la secuencia en la región variable de los *rfs*, seguida por los tRNAs presentes en cada ISR1 de cada operón putativo. B) Se muestra la secuencia del tRNA encontrado en el ISR1 de 579 pb comparada con la secuencia del tRNA-Ala y el tRNA-Val encontrada en la mayoría de los ISR1s. C) La secuencia del tRNA-Ala encontrada en el ISR1 de 542 pb comparada con la de los tRNAs-Ala encontrada en los otros ISR1s.

Como fue previamente observado para la misma cepa de *V. parahamolyticus* por Maeda y col. (2000), las secuencias de los ISR1s permitieron distinguir seis grupos diferentes entre las 4 bandas observadas por PAGE de los productos de amplificación por PCR. Las secuencias obtenidas resultaron prácticamente iguales a aquellas reportadas por Maeda y col. (2000), excepto que en nuestro caso observamos un ISR1 adicional. Este ISR1 consiste en una secuencia de 579 nucleótidos que corresponde a una quimera o recombinante del extremo 5' del ISR1 de 524 pb y del extremo 3' del ISR1 de 669 pb. El sitio de recombinación parece ubicarse en el tRNA-Ala del ISR1 de 524 pb y el tRNA-Val del ISR1 de 669 pb (Fig. 8B).

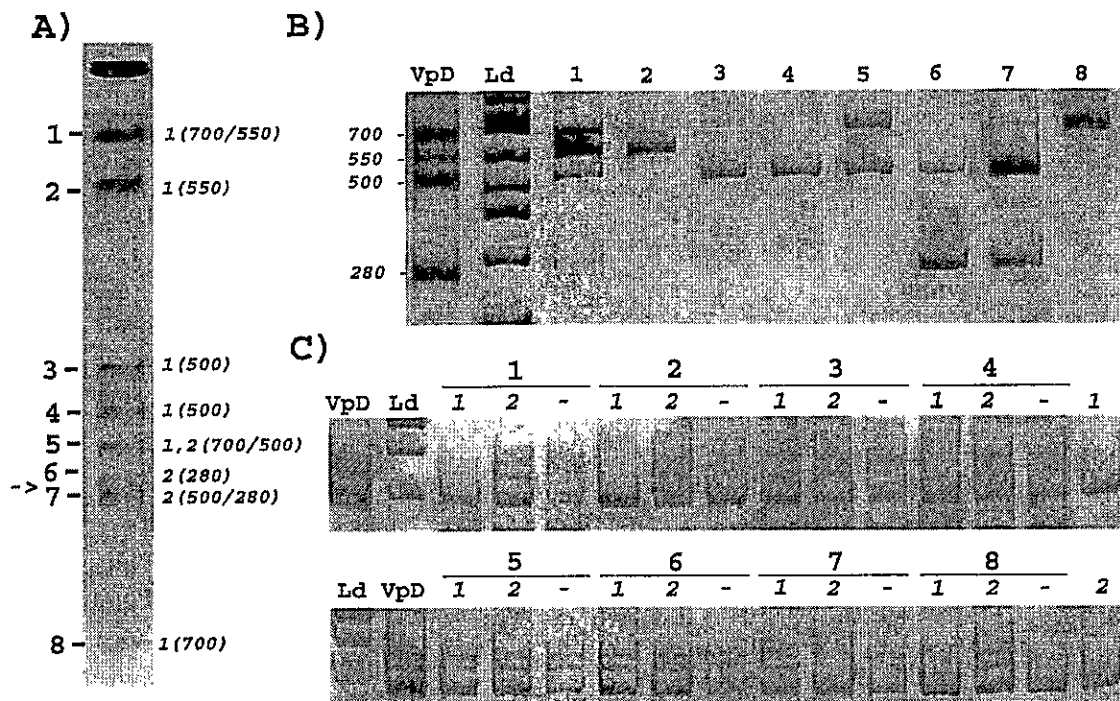
Los tRNAs para el mismo amino ácido presentes en más de un ISR1 son idénticos y probablemente evolucionan en concierto. El tRNA-Ala encontrado en el ISR1 de 542 pb parece ser una excepción pues muestra una secuencia muy diferente a la encontrada en los de otros ISR1s (Fig. 8C).

### **2.1.2 Caracterización de los operones *rm* por electroforesis en campo pulsado (PFGE).**

El hallazgo de un ISR1 que pudiera corresponder a una quimera originada durante la amplificación por PCR, hizo imprescindible descartar que algunas de las combinaciones de *rms*-ISR1 observadas, no se hubieran también generado durante la amplificación. Por esta razón, se definieron los operones por un método diferente, en el cual los operones ribosomales se separaron previo al análisis por PCR. Los diferentes operones *rm* se

separaron por PFGE desde DNA digerido con la enzima de restricción *I-CeuI*. Esta enzima corta en una secuencia específica de 19 pb (5'-TCGCTACCTTAG<sup>A</sup>GACCGTTATAGTTA-3') situada en el gene 23S rRNA de *V. parahaemolyticus* (Makino y col., 2003). En cada una de las bandas obtenidas se determinó el tipo de *rrs* y el tamaño del ISR1, empleando la misma metodología usada para el análisis de los diferentes clones, descrita más arriba. En la Fig. 9A se muestra el resultado del PFGE con las bandas distinguidas numeradas del 1 al 8. A la derecha de cada banda se indica el tipo de *rrs* y el tamaño del ISR1 (entre paréntesis). En la Fig. 9B se muestran los ISR1s observados luego de la amplificación de cada banda; la observación de más de un ISR1 en algunas bandas (bandas 1, 5 y 7) se debe probablemente a la co-migración de dos fragmentos de restricción o a la presencia de dos operones con direcciones opuestas en un mismo fragmento de digestión. En la Fig. 9C se muestra el resultado del ensayo de heteroduplete entre los fragmentos de *rrs* de 161 pb amplificados de cada banda obtenida en el PFGE. Como se describió anteriormente, la migración de los híbridos formados permite definir el tipo de *rrs*. En algunas bandas la presencia de un solo tipo de *rrs* es evidente, como la presencia de la del tipo 1 en la banda 1, 2 y 8 o del tipo 2 en la banda 6. La banda 5 es una excepción pues muestra la formación de heterodupletes cuando se hibrida con amplicones de los clones ya sea del tipo 1 o 2, e incluso consigo misma. Este tipo de resultado se debe probablemente a la presencia en esta banda de dos operones *rrn* conteniendo *rrs* de diferente tipo. Los heterodupletes observados con esta banda también se observaron en otras pero en una

proporción mucho menor. En estos casos su presencia es probablemente producto de la contaminación con otros fragmentos de restricción.



**Fig. 9. Separación de los fragmentos genómicos conteniendo los operones *rrm* y caracterización de sus *rrs* y los ISR1s en la cepa VpD.** A) Electroforesis en campo pulsado del DNA digerido con *I-CeuI*. El número asignado para cada banda se indica en el lado izquierdo, el tipo de *rrs* y el tamaño aproximado de los ISR1s (entre paréntesis), observado en cada banda son indicados al lado derecho. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ISR1s obtenidos por amplificación por PCR como se describe en Materiales y Métodos. El número encima de cada carril corresponde a la banda analizada. VpD corresponde al producto de la amplificación del DNA de *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>. Ld corresponde a un marcador de peso molecular de 100 pb. C) Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos formados luego de la denaturación y renaturación de una mezcla de los productos de amplificación de la región variable de los *rrs* contenidos en cada banda (indicada en la parte de arriba cada 3 carriles) con los productos de la amplificación de los clones conteniendo *rrs* ya sea del tipo 1 o del tipo 2 o con ellos mismos (indicados como 1, 2 ó -, en la parte de arriba de cada carril, respectivamente). 1 y 2 en los carriles finales hacia la derecha corresponden a una auto-renaturación de los productos de los clones *rrs* 1 y 2. VpD y Ld como se indica en B).

En su conjunto, estos resultados permitieron distinguir 11 posibles operones ribosomales con una composición similar a la obtenida por amplificación por PCR y clonamiento pero no se encontraron los operones *rrs1*-ISR1-278 y el *rrs2*-ISR1-579.

### **2.1.3 Polimorfismo en la región espaciadora 16S-23S rDNA de la familia de operones *rm*.**

Las regiones espaciadoras 16S-23S rDNA pueden ser divididas en bloques conteniendo secuencias conservadas y variables (Gurtler y Stanisich, 1996). El análisis de las secuencias de la cepa VpD, mostró que los bloques correspondientes a los primeros 40 nucleótidos del extremo 5' y a los 208 nucleótidos del extremo 3' de los ISR1, se encontraban altamente conservados en cada operón *rm*. En estos bloques, altamente conservados, se pudo observar varios sitios polimórficos que parecen haberse originado por eventos de conversión génica. Dentro de los 40 sitios del extremo 5', se encontró un sitio polimórfico que presenta una T en dos de los operones putativos y una A en los otros ocho. En las 208 bases en el extremo 3' se encuentra un sitio polimórfico que presenta una T en cuatro de los operones ribosomales putativos y una G en los otros seis. La presencia de las mutaciones puntuales iguales en el mismo sitio de dos o más operones, fue probablemente causada por eventos de conversión génica. Como se describió anteriormente, los tRNAs representan otro tipo de bloques conservados en los ISR1s. En los operones *rm* de *V. parahaemolyticus* se

observaron tRNAs para cinco distintos aminoácidos. Cada uno se encuentra repetido en más de un operón y con la misma secuencia excepto el tRNA-Ala (Fig. 8).

## **2.2 Síntesis y degradación de los dos tipos de 16S rRNA en *V. parahaemolyticus* ATCC 17802<sup>T</sup>.**

### **2.2.1 Expresión de los diferentes tipos de *rrs* en *V. parahaemolyticus*.**

Para explorar si los dos tipos de genes 16S rRNA se expresaban se determinó la composición del rRNA en fase exponencial de crecimiento. Con este objeto se aisló el RNA total y posteriormente se amplificó el 16S rRNA por RT-PCR en dos etapas. La primera consistió en una reacción de RT empleando hexámeros randomizados y la segunda en una amplificación por PCR del cDNA resultante, empleando partidores específicos para una pequeña región del gene 16S rRNA que contiene la región variable (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la Fig. 10 (carril 13), se observó un polimorfismo en el 16S rRNA similar al observado para el 16S rDNA (carril 2). Esta observación implica que en la condición de cultivo empleada se estarían expresando ambos tipos de genes *rrs*.

## 2.2.2 Degradación de los distintos 16S rRNA en estado de escasez de nutrientes.

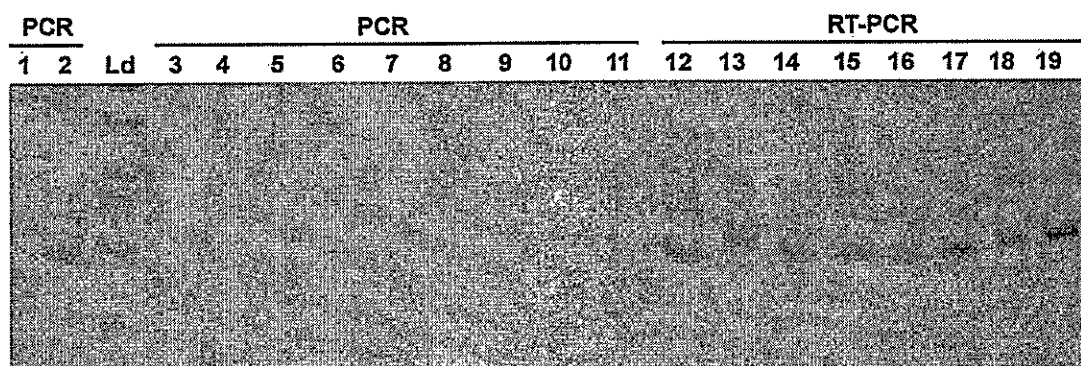
La cantidad de rRNA en la célula depende de la velocidad de síntesis y de la velocidad de degradación. En *E. coli* se postula que la síntesis de 16S rRNA desde operones ribosomales diferentes estaría regulada diferencialmente en dependencia de las condiciones en que se encuentre la bacteria (Hirvonen y col., 2001). La degradación del 16S rRNA en escasez de nutrientes, donde ésta ocurre en forma extensiva ha sido muy poco estudiada. Para estudiar la existencia de una posible degradación selectiva de uno de los dos tipos de 16S rRNAs presentes en la cepa VpD, se realizó un análisis por RT-PCR de los rRNA remanentes después de escasez de nutrientes en varias condiciones. Con este objeto se incubó *V. parahaemolyticus* (provenientes de un cultivo exponencial) a una concentración de  $10^6$  células/ml en AMA, a 4°C, 15°C y 37°C. Posteriormente se analizó el nivel de RNA. Se observó que el RNA total disminuye rápidamente y que a las 72h en AMA el 96-98% ha sido degradado (Tabla 2).

**TABLA 2. RNA total en escasez de nutrientes a distintas temperaturas en comparación con fase exponencial.**

% RNA (escasez/ normal exponencial)x100							
		24 h en AMA			72 h en AMA		
Fase exp.	Fase Est.	4°C	15°C	37°C	4°C	15°C	37°C
100	36	4	13	2	4	4	<2



Como el RNA celular está compuesto en su mayoría (aprox. 98%) por RNA del tipo ribosomal, puede estimarse que mas del 90% de los rRNA presentes en la fase exponencial de *V. parahaemolyticus* ha sido degradado a este tiempo. Para determinar la cantidad relativa de los dos tipos de rRNA presentes en VpD se examinó la formación de heterodupletes después de RT-PCR del rRNA residual. En la Figura 10 se muestra que el patrón observado en las diferentes condiciones fue indistinguible del obtenido luego de amplificar el 16S rDNA, indicando que en el 16S rRNA existe un polimorfismo similar al observado en los genes 16S rRNA y que por lo tanto no existiría una degradación selectiva de uno de las dos tipos de secuencias.



**Fig. 10. PAGE de los productos obtenidos mediante la amplificación por PCR y RT-PCR del RNA remanente de *V. parahaemolyticus* 17802.** El producto de la amplificación por PCR del rDNA de VpD se muestra en el carril 2. Del carril 3-11 es el PCR de las muestras de RNA: 3 (agua de la reacción RT); 4 (RNA Fase Exponencial), 5 (RNA Fase Estacionaria), 6 (RNA 4°C, 24h), 7 (RNA 15°C, 24h), 8 (RNA 37°C, 24h), 9 (RNA 4°C, 72h), 10 (RNA 15°C, 72h), 11 (RNA 37°C, 72h). Carril 12-19 RT-PCR de las muestras de RNA: 12 (RNA Fase Exponencial), 13 (RNA Fase Estacionaria), 14 (RNA 4°C, 24h), 15 (RNA 15°C, 24h), 16 (RNA 37°C, 24h), 17 (RNA 4°C, 72h), 18 (RNA 15°C, 72h), 19 (RNA 37°C, 72h). Ld corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

## 2.3 Análisis del linaje de cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* mediante la comparación de los espaciadores 16S-23S rRNA.

### 2.3.1 Genes *rrs* en las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus*.

Cuando se amplificó el 16S rDNA desde la cepa O3:K6 (VpKX), perteneciente al clon pandémico, no se observaron heterodupletes como en el caso de VpD. Esta observación fue congruente con la presencia de genes *rrs* idénticos en su genoma (Makino y col., 2003). En la Fig. 11A se muestra el resultado de la amplificación por PCR de los genes *rrs* de la cepa pandémica VpKX, y de VpD y otras dos cepas no pandémicas; VpAQ un aislado O3:K6 obtenido en 1991, y Vpl un aislado O4:K12, obtenido en 1968. Este último aislado a pesar de pertenecer a un serotipo diferente, comparte muchas propiedades con las cepas pandémicas clonales O3:K6., como ser Kanagawa positiva, *tdh+*, *trh-*, y *ure-* (M. Yoh, RIMD, Osaka University, comunicación personal). Se observaron heterodupletes con una migración retardada con las cepas VpD y VpAQ, pero no con VpKX y Vpl. La naturaleza de heterodupletes de las bandas con migración retardada se confirmó como se describió previamente (Espejo y col., 1998) (resultados no mostrados). Para determinar si la ausencia de polimorfismo en los *rrs* de la cepa VpKX era característica general de las cepas pandémicas, se analizaron los genes *rrs* de 10 cepas adicionales pertenecientes a este clon pandémico (Tabla 1, ver materiales y métodos). Al igual que VpKX ninguna

de estas cepas mostró formación de heterodupletes (resultados no mostrados).

Para establecer si el polimorfismo en los genes *rrs* de la cepa VpAQ se encontraba en la misma región que en VpD, se amplificó un fragmento pequeño de 161 pb que contiene dicha región. Los resultados obtenidos (Fig. 11B) indicó que el polimorfismo en la cepa VpAQ, se encuentra en la misma región del gene *rrs* observada en VpD.

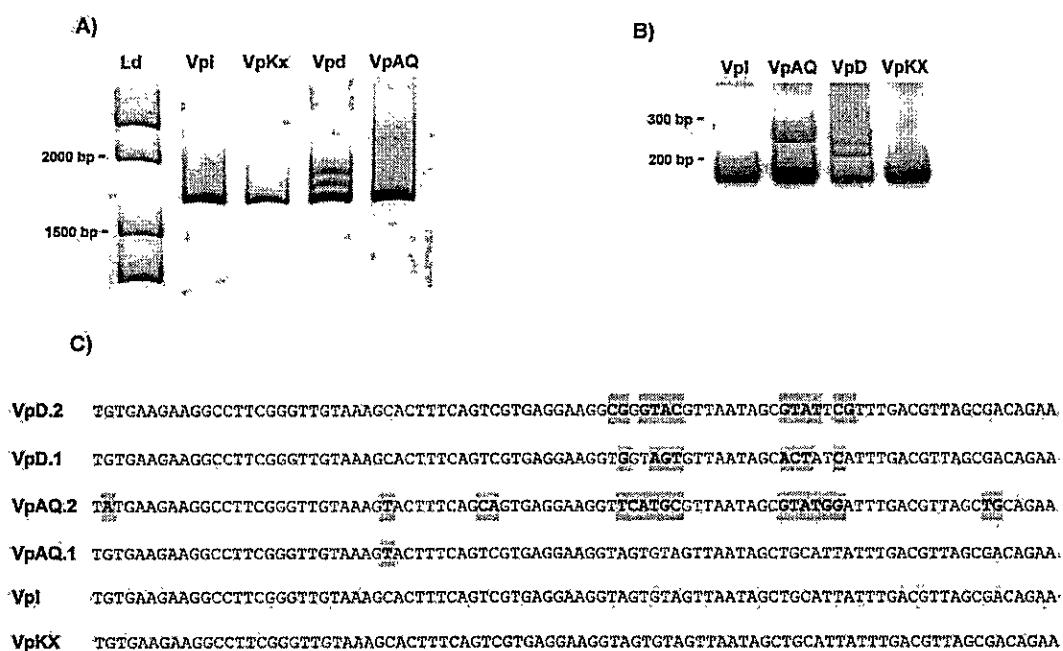
Para estimar el tipo de *rrs* en los diferentes operones *rrn* de VpAQ se utilizó el mismo procedimiento empleado con la cepa VpD como se describe en la sección 2.1 de esta tesis. Se analizaron los operones ribosomales presentes en 30 clones de VpAQ, por el tamaño del ISR1 y el tipo de *rrs* presente. Los clones fueron inicialmente agrupados de acuerdo al tamaño de los ISR1s. A continuación se determinó el tipo de *rrs* asociado a cada grupo de ISR1s por el ensayo de formación de heterodupletes. Posteriormente, se secuenció al menos un clon de cada grupo de tamaño de ISR1 y de tipo de *rrs*. Entre los 30 clones examinados, 28 presentaban un *rrs* con el tipo de secuencia presente en ambos, VpI y VpKX, y solamente 2 presentaron un *rrs* con la secuencia diferente. Estos 2 clones contenían un ISR1 de 476 pb, y podrían derivarse del mismo operón *rrn* (Tabla 3).

**Tabla 3. Tamaño y composición de tRNAs de las ISR1 de VpAQ.**

Tamaño ISR1 (pb)	Tipo de <i>rrs</i>	tRNAs	# de clones sec.
669	A	Glu, Lys, Val	3
613	A	Ile, Ala, Val	1
542	A	Ala, Glu	1
522	A	Ile, Ala	1
476	A	Glu	1
476	B	Glu	2
278	A	no	2

\*: Tipo de *rrs* A corresponde a la secuencia casi idéntica encontrada en VpKX, excepto por una base, mostrada en la Fig. 11. Tipo *rrs* B corresponde a una secuencia diferente a las de VpD, también mostrada en la Fig. 11.

En la Fig. 11C se muestra las diferencias en las secuencias de los 16S rRNA de las cuatro cepas estudiadas. Las secuencias de las cepas VpAQ y VpI se determinaron en la forma descrita anteriormente para VpD. Las cepas VpD y VpAQ contienen *rrs* polimórficos con dos tipos de secuencias. Las dos secuencias encontradas en VpD son muy diferentes a las observadas en los *rrs* de VpKX y VpI. En cambio, la secuencia presente en la mayoría de los operones de VpAQ es idéntica, excepto en un sitio, a la encontrada en VpKX y VpI. Considerando las diferencias observadas en los 16S rRNA de las cuatro cepas en estudio, VpI y VpKX pertenecerían al mismo grupo, VpAQ estaría cercanamente relacionada a estas dos y VpD bastante menos relacionado.



**Fig. 11. Polimorfismo y diferencias en secuencia de los genes *rrs* en 4 cepas *V. parahaemolyticus*.** (A) PAGE de los productos de la amplificación de los genes *rrs* a partir de la posición 27 a la 1492 (numeración en *E. coli*). Ld corresponde al marcador de peso molecular, las flechas indican el tamaño del producto en pares de bases. (B) PAGE de los productos de la amplificación de los genes *rrs* a partir de la posición 357 a la 518 (numeración en *E. coli*). (C) Secuencias nucleotídicas de los genes *rrs* a partir de la posición 406 a la 496 (numeración en *E. coli*), los sitios que muestran mal apareamientos se indican con letra negrita dentro de una caja sombreada. Las cepas son: VpD, cepa tipo de la especie ATCC 17802T; Vpl, serotipo O4:K12 (1968) WP-1 o RIMD2210086; VpAQ serotipo O3:K6 (1991) AQ4673 o RIMD2210856; y VpKX serotipo O3:K6 (1996) KXV237 o RIMD2210633.

### 2.3.2 Análisis de los espaciadores 16S-23S rRNA en los múltiples operones *rrn*.

Para obtener un mayor conocimiento sobre la filogenia entre las cepas examinadas, se estudió la región espaciadora 16S-23S rRNA, una región más variable presente en todos los operones *rrn*.

El tamaño aparente de las ISR1s presentes en los operones *rrn* permitió distinguir las cepas VpKX y Vpl por la presencia de una banda adicional no observada en VpD y VpAQ (Fig. 12). Cada una de las otras 10 cepas pandémicas examinadas mostró un patrón de ISR1s idéntico a la cepa VpKX (resultados no mostrados).

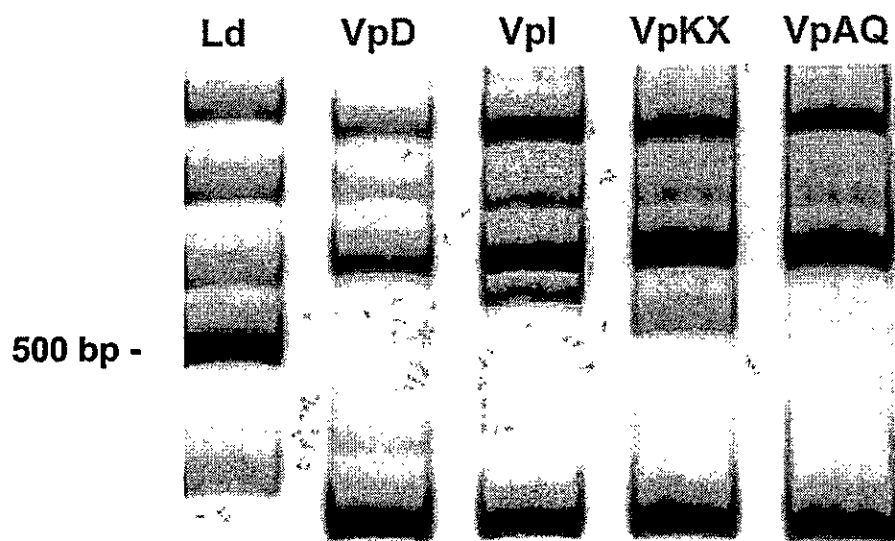


Fig. 12. PAGE de los productos de amplificación de las regiones espaciadoras 16S-23S rRNA en cepas de *V. parahaemolyticus*. VpD, cepa tipo de la especie (1951); Vpl, serotipo O4:K12 (1968); VpAQ serotipo O3:K6 (1991) AQ4673 (1991) y VpKX serotipo O3:K6 (1996). Ld corresponde al marcador de peso molecular, las flechas indican el tamaño del producto en pares de bases.

Con el objeto de examinar en detalle la diferencia en los ISR1s se determinó la secuencia de cada uno de ellos en la cepa que restaba conocer, Vpl. Esto se realizó empleando el mismo procedimiento de amplificación y secuenciación de los clones conteniendo ISR1s de distinto tamaño, como se realizó para VpD y VpAQ. La secuencia de los ISR1s en VpKX fue transcrita desde la secuencia publicada de su genoma. En la Tabla 4 se muestran los tamaños de los ISR1s observados en cada una de las 4 cepas de *V. parahaemolyticus* y los tRNAs que se encuentran en cada uno.

**TABLA 4. Tamaño y composición de las ISR1s en cepas de *V. parahaemolyticus*.**

<b>Tamaño del ISR1 – tRNAs que contiene</b>	<b>VpKX</b>	<b>Vpl</b>	<b>VpAQ</b>	<b>VpD</b>
706 – Glu-Lys-Ala(3)-Val	+	+		+
701 – Glu-Lys-Ala(2)-Val	+			
613 – Ala(3)-Val			+	
579 - Ile-Ala(Ala/Val)				+
669 – Glu-Lys-Val	+	+	+	+
542 – Ala(1)-Glu		+	+	+
527 – Ala(1)-Glu	+			
524/522 - Ile-Ala(3)	+	+	+	+
476 – Glu			+	+
461 – Glu		+		
431 – Glu	+			
278 – ninguno	+	+	+	+

Los números o letras en paréntesis se refieren al tipo de tRNA-Ala. Ala/Val se refiere a la quimera tRNA-Ala/tRNA-Val.

En las cuatro cepas examinadas, las secuencias de los tRNAs encontrados en las ISR1s de cada operón están altamente conservadas. La presencia del mismo tRNA en ISR1s de tamaños diferentes de diferentes aislados sugirió la existencia de una posible relación producto-precursor entre ISR1 de diferentes tamaños: Los ISR1s que contienen los tRNA-Glu de 461 y 431 pb presentes en Vpl y VpKX, respectivamente, corresponden probablemente a productos de deleciones de los ISR1s de 476 pb en VpD o VpAQ. La presencia del mismo tRNA-Ala en los ISR1s de 542 pb de VpD, VpAQ y Vpl, y en el ISR1 de 527 pb de VpKX, sugirió la existencia de una relación similar entre estos dos ISR1. La comparación de las secuencias de los ISR1s que contienen el tRNA-Glu reforzó esta sospecha. En la Fig. 13 se muestra las secuencias de los ISR1s en las 4 cepas que contienen tRNA-Glu. Se observaron diferencias en 2 sitios en el ISR1 de VpAQ y VpD. Estas diferencias se mantienen en Vpl y VpKX. Es evidente también una deleción y algunos sitios diferentes en Vpl con respecto a VpAQ y que estas diferencias se mantienen en VpKX. En esta última cepa se observó una deleción adicional ausente en las otras tres. Como se analiza en la Discusión estas diferencias sugieren eventos secuenciales que permiten inferir la ascendencia de las cepas del clon pandémico.



A)

VpD 260 CCATCTTTAAGCACATTTTTTTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAA... / ...GTCCCTTAAGAC 413  
VpAQ 260 CCATCTTTAAGCACATTTTTTTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAA... / ...GTCTTTAAGAC 413  
VpI 260 CCATCTTTAAGCACATTTTTTTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAA... / ...GTCTTTAAGAC 413  
VpKX 260 CCATCTTTAAGCACATTTTTTTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAA... / ...GTCTTTAAGAC 398

B)

VpD 41 ACGGTTTATAAAGTAAAGGAGAAAGAGATTACCAAACTCTCAGGTTTGGTCTCGCTTTTAAAGTGGAAACAGACAGCAGTGTCCCGTTCGTCTAGAGGCCCTAGGACACCGCCCT  
VpAQ 41 ACGGTTTATAAAGTAAAGGAGAAAGAGATTCCAAACTCTCAGGTTTGGTCTCGCTTTTAAAGTGGAAACAGACAGCAGTGTCCCGTTCGTCTAGAGGCCCTAGGACACCGCCCT  
VpI 41 ACGGTTTATAAAGTAAAGGAGAAAGAGATTCCCAAACTCTCAGGTTTGGTCTCGCTTTTAAAGTGGAAACAGACAGCAGTGTCCCGTTCGTCTAGAGGCCCTAGGACACCGCCCT  
VpKX 41 ACGGTTTATAAAGTAAAGGAGAAAGAGATTCCCAAACTCTCA... ATCCAGTGTCCCGTTCGTCTAGAGGCCCTAGGACACCGCCCT  
VpD 155 TTCACGGCGGTAACAGGGGTTTCGACTCCCTTADGGGATACCATCTTTAAGCACATTTCTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAATGGTTACTTCATTAGAAGTGATT  
VpAQ 155 TTCACGGCGGTAACAGGGGTTTCGACTCCCTTACGGGATACCATCTTTAAGCACATTTCTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAATGGTTACTTCATTAGAAGTGATT  
VpI 155 TTCACGGCGGTAACAGGGGTTTCGACTCCCTTACGGGATACCATCTTTAAGCACATTTCTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAATGGTTACTTCATTAGAAGTGATT  
VpKX 123 TTCACGGCGGTAACAGGGGTTTCGACTCCCTTACGGGATACCATCTTTAAGCACATTTCTTTTGATAAAGAAAGTATTAAGTGTCTTAAAAATGGTTACTTCATTAGAAGTGATT

Fig. 13. Secuencia nucleotídica de la región variable de los ISR1s 542/527 y 476/461/431 pb de las cepas de *V. parahemolyticus*. A) Alineamiento de

los ISR1 542/527 pb. B) Alineamiento de los ISR1 476/461/431 pb. Los 40 sitios conservados al inicio y los 206 hacia el final del espaciador no se muestran.

Las diferencias se indican en negrita y dentro de una caja sombreada.

### 2.3.3 Estimación de la distancia evolutiva entre cepas de *V. parahaemolyticus* mediante la comparación de otros genes.

Con el fin de determinar la distancia evolutiva entre las cepas estudiadas fueron secuenciados los genes *gyrB*, *rpoD* y el operón *toxRS*. Este último operón codifica para dos proteínas transmembrana involucradas en la regulación de genes asociados con la virulencia y han sido empleados para distinguir el clon pandémico O3:K6. Lamentablemente, el grado de diferencias entre estos genes fue insuficiente para obtener un árbol filogenético confiable (Tabla 5). El examen de las 7 posiciones en el operón *toxRS* que permiten distinguir el viejo clon O3:K6 del nuevo (Matsumoto y col., 2000), no permitió inferir un posible cambio secuencial entre las cepas, como fue observado para los ISR1s 476/461/431 (Tabla 6).

**TABLA 5. Similitud de los diferentes genes en cepas de *V. parahaemolyticus* al compararlas con esos mismo genes en la cepa pandémica VpKX.**

Cepa	Gene		
	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>toxRS</i>
Vpl	0.0153	0.0027	0.0112
VpAQ	0.0036	0.0034	0.0127
VpD	0.0144	0.0041	0.0104

La similitud fue calculada usando DNADISTversion 3.5c del programa BioEdit (Hall 1999).

**TABLA 6. Diferencias observadas en algunas posiciones determinadas en las secuencias del operón *toxRS* de las diferentes cepas de *V. parahaemolyticus*.**

Posición nucleotídica	Viejo O3:K6	VpAQ	VpD	Vpl	VpKX	Nuevo O3:K6
<b><i>toxR</i></b>						
576	G	-	-	-	A	A
900	G	-	A	-	A	A
1002	C	-	T	T	T	T
<b><i>toxS</i></b>						
1196	C	-	-	-	T	T
1214	A	-	-	-	T	T
1244	G	-	-	A	A	A
1463	A	-	-	-	T	T

## DISCUSION

El desarrollo de esta tesis contribuyó a una mejor caracterización de los operones ribosomales en bacterias marinas, especialmente en *V. parahaemolyticus*, objetivo principal de esta tesis. A continuación se discuten los logros alcanzados durante esta tesis.

### **1. Análisis de comunidades bacterianas de ostras mediante la amplificación por PCR de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rDNA.**

La existencia de un alto número de secuencias de 23S rDNA en la base de datos que mostraban mal alineamiento con el partidador reverso L1, comúnmente utilizado para la amplificación de los ISR1, sugirió que estas regiones no serían amplificables en una alta fracción de bacterias. Nuestros resultados indicaron, sin embargo, que los ISR1 de todas las colonias obtenidas por cultivo de las bacterias en las ostras son amplificables. Se descartaron potenciales artefactos como una amplificación inespecífica por baja restricción durante la etapa de alineamiento del PCR.

La explicación más simple para nuestra observación, de que cada colonia bacteriana presente en las muestras, rindiera productos de ISR1 luego de amplificarse por PCR, es que los grupos bacterianos con mal alineamiento en el sitio blanco para el partidador reverso L1 son muchos más escasos que lo observado en las bases de datos. La prevalencia real de este

sitio blanco en el 23S rDNA de los grupos bacterianos es difícil de estimar debido a que la mayoría de las especies bacterianas aún está por descubrirse (Amann y col., 1995). Experimentos similares examinando muestras a partir de otras fuentes que pudieran realizarse en el futuro podrían darnos una mejor inferencia de la abundancia de los diferentes tipos de secuencias DNA en la naturaleza. Una limitación ineludible del diseño de estos experimentos, sin embargo, es que están restringidos a la fracción de bacterias cultivable.

## **2. Caracterización y evolución concertada en la familia de operones ribosomales repetidos en la bacteria marina *V. parahaemolyticus*.**

### **2.1 Polimorfismo en la familia de operones ribosomales repetidos en *V. parahaemolyticus*.**

Hasta la fecha se han reportado secuencias nucleotídicas diferentes para el 16S rRNA de la cepa tipo de la especie de *V. parahaemolyticus*. Estas diferencias, se concentran en una horquilla variable del 16S rDNA, que incluye los nucleótidos 440-496, según numeración en *E. coli*, se muestran en la Fig. 14. La mayoría de los sitios polimórficos observados (Moreno y col., 2002), fueron reportados como tales en la secuencia encontrada por Woese (secuencia no publicada, número de acceso M59161). Por otro lado Dorsch y col.(1992) no encontraron polimorfismo en el cDNA obtenidos del 16S rRNA. Esto último sugiere que existe una transcripción selectiva de

estos genes. La secuencia descrita por Dorsch y col.(1992) corresponde a una de las observadas por nosotros excepto por dos sitios. Resultados preliminares obtenidos por nosotros, muestran sin embargo, que el polimorfismo observado en los cDNAs del 16S rRNA es similar al observado por amplificación del DNA. Por el contrario Ruimy y col. (1994), no notó ninguna diferencia entre las secuencias obtenidas por amplificación del rDNA 16S o de cDNAs a partir de los RNA ribosomales. Sin embargo, la secuencia que estos autores encontraron es bastante diferente a las secuencias reportadas, ya sea por Dorsch, Woese o las observadas por nosotros para los diferentes tipos de *rrs* en la cepa VpD y es posible que pertenezcan a otra cepa.

Woese M59161	GTCGTGAGGAAGGYGGG <b>ARY</b> GTTAATAGCRYTTTT <b>CRT</b> TTGACGTTAGCGACA
Dorsch X56580	GCCGTGAGGAAGGTGGCAGTGT <b>TA</b> ATAGCACCAT <b>CAT</b> TTGACGTTAGCGCCA
Results 1a	GTCGTGAGGAAGGTGGT <b>AGT</b> GT <b>TA</b> ATAGCA <b>CTAT</b> <b>CAT</b> TTGACGTTAGCGACA
Results 1b	GTCGTGAGGAAGGAGGT <b>AGT</b> GT <b>TA</b> ATAGCA <b>CTAT</b> <b>CAT</b> TTGACGTTAGCGACA
Results 1c	GTCGTGAGGAAGGTGGT <b>AGT</b> GT <b>TA</b> ATAGCA <b>CTAT</b> <b>CAT</b> CTGACGTTAGCGACA
Results 2	GTCGTGAGGAAGGCGGGT <b>ACG</b> T <b>TA</b> ATAGCGT <b>ATT</b> CGTTT <b>GAC</b> GTTAGCGACA
Ruimy X74720	GTCGTGAGGAAGGT <b>AGT</b> GT <b>TA</b> ATAGCTGCAT <b>NAT</b> TTGACGTTAGCGACA

**Fig. 14. Secuencias reportadas por diferentes autores para el fragmento que incluye la parte variable del gene 16S rRNA de *V. parahaemolyticus* ATCC17802<sup>T</sup>. Los autores y el número de acceso de la secuencia se indican a la izquierda. Los sitios mostrando nucleótidos diferentes se muestran en negrita.**

El análisis realizado mediante electroforesis en campo pulsado y clonación de los *rrs*-ISR, de los operones *rrm* en la cepa tipo de la especie ATCC 17802, mostró la presencia de al menos 7 operones conteniendo *rrs* del tipo 1 y otros 3 con la secuencia del tipo 2. Los resultados obtenidos por

ambos métodos no fueron sin embargo totalmente concordantes, no se observaron por PFGE dos de los 10 operones putativos observados por amplificación por PCR y posterior clonación de los productos. Estos operones corresponden a uno con el ISR1 de 579 pb asociado con un *rrs* de secuencia tipo 2 y a otro de 278 pb asociado con un *rrs* de secuencia tipo 1. El ISR1 de 579 pb no había sido observado en esta cepa por Maeda y col (2000), y es probable que pudiera consistir en una quimera que se formó durante la amplificación por PCR del DNA genómico. Por PFGE solo se observó el ISR1 de 278 pb asociado a *rrs* tipo 2. Es posible que *rrs* tipo 1 asociado a este ISR1 haya pasado desapercibido al co-migrar el fragmento de restricción con alguno de los otros fragmentos.

La acumulación de tantos cambios compensatorios observados en las dos secuencias de *rrs* encontradas en VpD sugiere que la divergencia de estas dos secuencias es relativamente antigua y que ellas probablemente evolucionaron en cepas diferentes (o en especies). Probablemente uno de los tipos fue adquirido por transferencia lateral. Esta transferencia pudiera ocurrir vía reemplazo de segmentos de genes que contendrían dominios del rRNA, como ha sido propuesto en su hipótesis simplificada de la complejidad por Wang y Zhang (2000).

El polimorfismo en los *rrs* observado en la cepa tipo no se observó en las cepas pertenecientes al clon pandémico de *V. parahaemolyticus* detectado por primera vez en 1996. Las cepas de este clon mostraron además una secuencia diferente en la región polimorfica de la cepa tipo. Al ser una bacteria autóctona del mar, *V. parahaemolyticus* está probablemente

sometido a un elevado nivel de recombinación con las numerosas bacterias que abundan en el ambiente marino. El agua de mar es un ambiente particular en donde *V. parahaemolyticus* podría encontrarse expuesto a un alto nivel de transferencia de genes mediante transducción (Jiang y Paul, 1998); esperábamos, que si las cepas pandémicas se propagan en este medio, alguno de los aislados, obtenidos en diferentes regiones del mundo (ver Tabla materiales y Métodos), podrían mostrar polimorfismo en sus múltiples genes *rrs* generado por introducción de algún *rrs* desde bacterias cercanamente relacionadas pero con diferencias en su 16S rRNA. Sin embargo contrario a lo esperado, esto no fue observado en las cepas analizadas. Es posible que el análisis de otros aislados pandémicos que se obtengan luego de un tiempo más prolongado, desde el surgimiento de la pandemia, muestre la aparición de cepas con polimorfismo en sus *rrs*. El descubrimiento de aislados con estas características sería extremadamente útil para el entendimiento de la transferencia lateral de genes. Por otro lado, también es posible que la existencia de un solo tipo de *rrs* en *V. parahaemolyticus*, confiriera una ventaja selectiva y que cepas con polimorfismo generado por transferencia sean seleccionadas negativamente. Una ventaja selectiva podría consistir en resistencia a antibióticos, sin embargo, una revisión de los sitios en los 16S rRNA bacterianos asociados con resistencia (Recht y col., 1999; Hu y Ochi, 2001) no mostró una relación directa con las regiones que poseían las diferencias en secuencia. Otra ventaja podría generarse por una mayor generación de ribosomas ya que la



región encontrada polimorfica en VpD parece interactuar con la proteína S4, con un rol determinante en el armado del ribosoma (Sapag y col., 1990).

## **2.2 Conversión génica en la familia de operones ribosomales repetidos en *V. parahaemolyticus*.**

### **2.2.1 Conversión en los genes *rrs*.**

La observación de que hay más de un operón contiene cada uno de los dos tipos de *rrs* diferentes encontrados en VpD sugiere fuertemente que hay conversión génica entre los operones *rrn* de esta bacteria. Considerando el número de nucleótidos diferentes observados en los dos tipos de secuencia de *rrs* y las mutaciones del tipo compensatorio requeridas para su generación, es muy improbable que un *rrs* con las mismas once diferencias aparezca independiente en otro operón. La explicación más simple para la existencia de estas secuencias redundantes, es que se generaron por un mecanismo de conversión génica, que homogenizaría los operones repetidos.

El hallazgo de polimorfismo en la familia de *rrs* repetidos de algunas cepas de *V. parahaemolyticus*, probablemente generado por transferencia lateral, tiene una gran importancia en el uso de los genes 16S rRNA para los estudios filogenéticos porque se considera que la transferencia lateral de genes *rrs* es muy poco probable. La existencia de conversión génica de los

genes *rrs* repetidos en *V. parahaemolyticus* sugiere que un *rrs* transferido lateralmente podría convertir todo el resto de los operones.

### 2.2.2 Conversión en los espaciadores 16S-23S rDNA.

La observación de *rrs* diferentes (tipo 1 o 2) asociados con ISR1s de secuencias iguales, sugiere que los eventos de conversión génica de los *rrs* observados no incluyeron a los ISR1s vecinos. La conversión génica, sin embargo, también parece ocurrir en los ISR1s. Solo así es posible explicar la alta conservación observada en los bloques de secuencias encontrados en el extremo 5' y 3' de todos los ISR1s, y en los tRNAs. Estas observaciones anteriores, junto con las de los *rrs*, sugieren que la homogenización de los genes repetidos ocurre eficientemente en VpD y que el polimorfismo observado en los genes *rrs* de esta cepa no se debe a un defecto en dicha función.

Aunque los tRNAs contenidos en los ISR1s parecen ser homogeneizados eficientemente ya los tRNAs para el mismo aminoácido en mas de un ISR1 resultaron idénticos, excepto por los tRNAs-Ala. Este parece constituir una familia de tRNA especial: De los cuatro tRNA-Ala en diferentes ISR1s, uno de ellos, encontrado en el ISR1 de 579 pb, es probablemente una quimera entre tRNA-Ala y tRNA-Val. El otro, encontrado en el ISR1 de 542 pb, presenta 11 sitios diferentes con los otros dos tRNA-Ala, presentes en los ISR1s de 524 y 706 pb. Este caso, sin embargo, no parece ser similar al del 579 pb pues un tRNA-Ala con idéntica secuencia

está también presente en el ISR1 de 527 pb de la secuencia del genoma de la cepa VpKX (Makino y col., 2003). La presencia del mismo tRNA en estas dos cepas indica que el ISR1 de 527 pb se originó antes que empezaran a evolucionar independientemente.

### **2.3 Análisis del linaje de cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* mediante la comparación de sus genes 16S rRNA y los espaciadores 16S-23S rRNA.**

Como ya se mencionó en Resultados, las diferencias observadas en los 16S rRNA de las cuatro cepas en estudio, permiten inferir que VpI y VpKX pertenecerían al mismo grupo, VpAQ estaría cercanamente relacionada a estas dos y VpD bastante alejado. La comparación de los ISR1s permite avanzar en la descripción de la relación filogenética entre estas cuatro cepas.

Las cepas del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se distinguen de otros aislados por varias propiedades ya señaladas. Aquí mostramos que también se distinguen de la cepa tipo por la migración electroforética de uno de los ISR1. Los ISR1 de *V. parahaemolyticus*, contienen bloques de secuencias en los extremos 5' y 3' altamente conservados, tanto entre los diferentes operones *rrn* de la misma cepa como entre operones de cepas distintas. La comparación de las secuencias entre ISR1s correspondientes de las cuatro cepas permitió inferir la historia evolutiva de estas cepas. La explicación más simple de las diferencias

observadas entre los ISR1s de 542 y 527 pb, conteniendo los tRNA-Ile y tRNA-Ala1, es que el ISR1 de 527 pb presente en VpKX se generó por una deleción ocurrida en el de 542 pb presente en las otras tres. El mismo razonamiento aplicado a los ISR1s conteniendo exclusivamente el tRNA-Glu, sugiere que la secuencia evolutiva de este ISR1 fue VpD->VpAQ->VpI->VpKX. El ISR1 de 476 pb de la cepa VpD habría generado por dos mutaciones el ISR1 de 476 pb en la cepa VpAQ, este ISR1 generó a su vez por una deleción el ISR1 de 461 pb encontrado en VpI. Este último habría generado por una deleción adicional el ISR1 de 431 pb presente en VpKX. Esta secuencia de eventos sugiere que la cepa VpAQ O3:K6, aunque aislada en 1991, se encuentra filogenéticamente más distante con relación a las cepas pandémicas que la cepa VpI de serotipo O4:K12 que fue aislada en 1968. Esta última cepa es Kanagawa positiva, una propiedad relacionada altamente con la virulencia en esta bacteria, encontrándose esta propiedad ausente en VpAQ. Laohaprertthisan y col. (2003) han encontrado recientemente serovariantes O4:K12, el mismo de VpI, que fueron consideradas como derivadas del clon pandémico, debido a que compartían muchas características de las tempranas cepas pandémicas. Lo demostrado anteriormente sugiere que estos nuevos aislados con serotipo O4:K12 podrían haber surgido por la adquisición de mayor virulencia por cepas más cercanamente relacionadas con idénticos serotipos, como VpI, en lugar de un cambio en el serotipo de las cepas del clon pandémico originalmente O3:K6.

## 2.4 Síntesis y degradación de los dos tipos de 16S rRNA en *V. parahaemolyticus* ATCC 17802<sup>T</sup>.

El análisis realizado de la expresión de los genes *rrs* en la cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus*, mostró que ambos tipos de *rrs* presentes en esta cepa se expresaban durante crecimiento exponencial. Al menos en la condición analizada no existiría una regulación selectiva de la expresión de los *rrs*.

Por otro lado, se conoce que los rRNA son altamente degradados durante condiciones de escasez de nutrientes, fase estacionaria y en condiciones de crecimiento lento (Kramer y Singleton, 1992; Deutscher, 2003). En la cepa tipo de *V. parahaemolyticus*, se encontró al igual que en la mayoría de las bacterias una degradación acelerada del RNA total y del rRNA, que compone aproximadamente el 98% del RNA celular (Deutscher, 2003). Se observó además que la degradación de los 16S RNA no fue selectiva. Sin embargo en nuestro caso particular, no pudimos determinar si el rRNA analizado corresponde a rRNA sintetizado de *novo* o simplemente al rRNA remanente.

La posesión de múltiples genes ribosomales ha sido relacionada con la capacidad de algunos microorganismos de responder de una manera acelerada a cambios en los medios de cultivo ricos en nutrientes y existen algunas evidencias que sugieren una regulación diferencial de la expresión de los diferentes operones en el mismo genoma (Hirvonen y col., 2001). Otra

Lan R, Reeves PR. 1998. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **144**:1213-1221.

Laohaprertthisan V, Chowdhury A, Kongmuang U, Kalnauwakul S, Ishibashi M, Matsumoto C, Nishibuchi M. 2003. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol Infect* **130**:395-406.

Liao D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* **64**:24-30.

Liao D. 2000. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol* **51**:305-317.

Liu SL, Sanderson KE. 1995. I-Ceul reveals conservation of the genome of independent strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**:3355-3357.

Maeda T, Takada N, Furushita M, Shiba T. 2000. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **192**:73-77.

Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Jr., Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM. 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**:173-174.

Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *Lancet* **361**:743-749.

Matin A, Auger EA, Blum PH, Schultz JE. 1989. Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol* **43**:293-316.

Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, Wong HC, DePaola A, Kim YB, Albert MJ, Nishibuchi M. 2000. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol* **38**:578-585.

Moreno C, Romero J, Espejo RT. 2002. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. *Microbiology* **148**:1233-1239.

Myers ML, Panicker G, Bej AK. 2003. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* **69**:2194-2200.

Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K, Makino K, Shinagawa H, Honda T. 2000. A filamentous phage associated with recent

pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. J Clin Microbiol **38**:2156-2161.

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A **76**:5269-5273.

Ojaimi C, Davidson BE, Saint G, I, Old IG. 1994. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. Microbiology **140**:2931-2940.

Okuda J, Ishibashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibuchi M. 1997a. Analysis of the thermostable direct hemolysin (tdh) gene and the tdh-related hemolysin (trh) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. J Clin Microbiol **35**:1965-1971.

Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya SK, Nair GB, Nishibuchi M. 1997b. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. J Clin Microbiol **35**:3150-3155.

Okuda J, Nishibuchi M. 1998. Manifestation of the Kanagawa phenomenon, the virulence-associated phenotype, of *Vibrio parahaemolyticus* depends on a particular single base change in the promoter of the thermostable direct haemolysin gene. Mol Microbiol **30**:499-511.



Orcutt KM, Rasmussen U, Webb EA, Waterbury JB, Gundersen K, Bergman B. 2002. Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques. *Appl Environ Microbiol* **68**:2236-2245.

Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Watanabe H. 2002. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *J Clin Microbiol* **40**:2708-2709.

Perez LS, Rodriguez-Valera F, Lan R, Reeves PR. 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, Espejo RT. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl Environ Microbiol* **62**:1323-1328.

Pruzzo C, Tarsi R, Del Mar LM, Signoretto C, Zampini M, Pane L, Colwell RR, Canepari P. 2003. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ Microbiol* **5**:850-858.

Randazzo CL, Torriani S, Akkermans AD, de Vos WM, Vaughan EE. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* **68**:1882-1892.

Recht MI, Douthwaite S, Puglisi JD. 1999. Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* **18**:3133-3138.

Romero J, Garcia-Varela M, Laclette JP, Espejo RT. 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microb Ecol* **44**:365-371.

Ruimy R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Christen R. 1994. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **44**:416-426.

Sambrook, J and Russell, DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* . 3. 2000. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sapag A, Vartikar JV, Draper DE. 1990. Dissection of the 16S rRNA binding site for ribosomal protein S4. *Biochim Biophys Acta* **1050**:34-37.

Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC. 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol* **67**:3557-3563.

Tagomori K, Iida T, Honda T. 2002. Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *J Bacteriol* **184**:4351-4358.

Tijssen P. 1993. *Hybridization with nucleic acid probes*. Amsterdam: Elsevier.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Venter JC, . 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.

Vakulenko SB, Mobashery S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* **16**:430-450.

Van de PY, De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci* **10**:569-570.

Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. 1998. 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**:681-687.

Wang Y, Zhang Z. 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.

Weinbauer MG, Fritz I, Wenderoth DF, Hofle MG. 2002. Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. *Appl Environ Microbiol* **68**:1082-1087.

Wong HC, Wang P. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol* **96**:359-366.

## ANEXO 1

Algunos ejemplos de bacterias que presentarían complementariedad completa con el partidador reverso y otras con los sitios de mal apareamiento con la secuencia blanco del partidador L1 en el gene 23S rRNA reportados en las bases de datos. Los microorganismos mostrados son: *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Frankia* sp., *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlorobium limicola*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Flexibacter flexilis*, *Synechococcus* sp. str. CIP 6301, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium leprae*, *Thermotoga maritima*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rb. sphaeroides*, *Ruminobacter amylophilus*, *Pirellula marina*, *Flavobacterium odoratum* y *Pseudomonas cepacia*.

Secuencia partidador L1- 5' CAAGGCATCCACCGT 3'

	<b>Secuencia blanco</b>
<b>Bacterias</b>	<b>3' ACGGUGGAUGCCUUG 5'</b>
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Bacillus subtilis</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Frankia</i> sp.	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Streptomyces griseus</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Chlorobium limicola</i>	23 ACGGUGGAUGCCUUG 37
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21 ACGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Flexibacter flexilis</i>	21 AUGGGGAUGCCUAG 35
<i>Synechococcus</i> sp. str. CIP 6301	21 ACGGUGGAUACCUAG 35
<i>Micrococcus luteus</i>	21 AUGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Mycobacterium leprae</i>	21 AUGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Thermotoga maritima</i>	21 GCGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	21 UUGGUGGAUGCCUUG 35
<i>Rb. sphaeroides</i>	21 UUGGUGGAUGCCUAG 35
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	21 AUGGUGGAUGCCUAG 35
<i>Pirellula marina</i>	21 AUGGGGAUGUCUUG 35
<i>Flavobacterium odoratum</i>	21 AUGGGGAUGCCUAG 35
<i>P. cepacia</i>	21 GUGGUGGAUGCCUUG 35



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Microbiological Methods 55 (2003) 91–97

Journal  
of Microbiological  
Methods

[www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)

## Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer region

Narjol González, Jaime Romero, Romilio T. Espejo\*

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

Received 31 January 2003; received in revised form 31 March 2003; accepted 31 March 2003

### Abstract

PCR amplification of the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes is commonly employed for the analysis of bacterial communities. In this analysis, the intergenic spacers are amplified by PCR using primers complementary to conserved regions in the 3' 16S rDNA and 5' 23S rDNA. By this method, the observation of every bacterial population may be limited by several causes. To explore the extent of bacterial populations overlooked by this method, we have used an empirical approach. In a sample containing about 50 colonies, we tested the capability to amplify by PCR the spacers from each colony. We also examined the ability to observe the spacers from each colony in the product obtained after amplification of the DNA extracted from the whole sample, as it is usually performed by this method. Contrarily to our expectations that a significant fraction of colonies would not yield amplification products, spacers were successfully amplified from every colony of two different samples examined. Overall, our results suggest that in spite of well-based theoretical limitations, the analysis of bacterial communities by amplification of the spacer regions can render a comprehensive representation of the more abundant bacterial clades in the sample.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** ISR; Ribosomal RNA spacer; Spacer

### 1. Introduction

DNA-based, culture-independent techniques have provided new ways to examine bacterial communities. These methods rely on the analysis of diverse microbial genes that are expected to be present in every bacteria of the examined community. Among others, PCR amplification of the ribosomal spacer regions has been frequently employed. This method is based on the

observation of PCR products corresponding to the short intergenic regions between the genes for the ribosomal 16S and 23S RNA, called intergenic spacer region or ISR1 (Jensen et al., 1993; Espejo and Romero, 1997; García-Martínez et al., 1999; Martín-Laurent et al., 1998; Zhongtang and Mohn, 2001). The ISRs are particularly suitable to distinguish species and even types within species because they show a great variability in size and sequence (Jensen et al., 1993). Bacteria with more than one ribosomal RNA operon (*rrn*) usually contain ISRs of different sizes (Jensen et al., 1993; Gürtler and Stanisich, 1996). The observation of a bacterial population by this method requires the presence of PCR-amplifiable spacers. If

\* Corresponding author. Tel.: +56-2-6781426; fax: +56-2-2214030.

E-mail address: [respejo@uec.inta.uchile.cl](mailto:respejo@uec.inta.uchile.cl) (R.T. Espejo).

the abundance of bacterial populations without PCR-amplifiable spacer is high, the representation of the actual bacterial diversity in a sample may be seriously limited. Failure to observe ISR1 after PCR amplification may be due to at least three different causes: (a) lack of the intergenic spacer, (b) intergenic spacers of size too large to be efficiently amplified, and (c) lack of the required sequence complementarity with the primers. A few of the well-characterized bacterial species do not have the usual *rrn* operon organization and lack ISR1. Among them are *Leptospira interrogans* (Fukunaga and Mifuchi, 1989), *Borrelia* spp. (Ojaimi et al., 1994), *Wolbachia pipientis* (Bensaadi-Merchernek et al., 1995), *Rickettsia* spp. (Andersson et al., 1999), and *Helicobacter pylori* (Tomb et al., 1997). In some bacterial species, ISR1 is larger than 1500 bp and its amplification is inefficient with the Taq polymerases commonly employed for PCR amplification. However, bacteria with very large ISR1 are very scarce; among the 2612 spacers included in the database RISSC, only 19 are larger than 1.4 kbp (<http://ulises.umh.es/RISSC/>). The most frequent cause for the failure of amplification is probably the lack of sufficient sequence complementarity of the primers with the target. Estimation of the fraction of bacterial populations overlooked by this method may be obtained based on the target sequence of those bacterial species or environmental clones for which both the 16S rRNA and 23S rRNA sequences are known. The most frequently used primers for the amplification of ISR1 are those described by Jensen et al. (1993). These authors selected the forward primer from a highly conserved region in a large number of 16S rRNA genes. However, the reverse primer was selected examining only five bacterial and four plant chloroplast 23S rDNA sequences. The target for this primer is much less conserved; Gürtler and Stanisich (1996) reviewed the sequences of 21 species that represent 8 genera, and showed that 8 contained at least 1 mismatch within the 5 bases next to the primer 3' end. In a recent analysis of the microbiota in oysters (Romero et al., 2002), we observed the predominance of bacteria related to *Arcobacter* spp. by amplification of 16S rRNA with "universal" primer, but we failed to detect these bacteria by amplification of the 16S–23S rRNA intergenic regions. This discrepancy was probably caused by the absence of an effective target for the reverse primer in the 23S rRNA. Overall, these observations suggest that a large fraction

of bacterial species could be missed in a community analysis based on PCR amplification employing the method described by Jensen et al. (1993). However, this estimation considers exclusively those bacterial groups with reported rRNA sequences, excluding the yet undiscovered bacterial groups which may be several orders of magnitude more numerous (Amann et al., 1995). Here, we have used an empirical approach to estimate the fraction of bacterial community that would be missed when a sample is analyzed by ISR1–PCR amplification, employing the method described by Jensen et al. (1993). We tested the occurrence of amplifiable spacers in bacterial populations present in particular samples. These samples were solid agar media containing about 50 colonies derived from homogenates of whole oysters. We analyzed each colony for the presence of amplifiable spacer and the correspondence with the ISR1 pattern observed after amplification of the DNA extracted from the total sample, as it is usually performed in this analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Oysters (*Tiostrea chilensis*, Philippi, 1845) were obtained from the hatcheries "Quihua", located at latitude 40°S in the Southern coast of Chile, on January 2002. Oysters were shucked, weighed, and an equal weight of cold sterile TE<sub>x</sub>10 (Tris 0.1 M, EDTA 0.01 M), NaCl 0.15 M, pH 7.8 was added. This mixture was subsequently homogenized in an ice bath with a Tissue Tearor (TM, model 985-370, Biospec Products WI, USA) at maximum speed for 3 min. Serial dilutions of homogenates were plated in marine agar (Difco) and the plates were incubated at 17 °C in either aerobic or anaerobic atmospheres. Merck Anaerocult C kit pack was employed, following manufacturer's instructions, to generate the anaerobic conditions. Those plates containing non-overlapping colonies were selected for replica plating in the same solid medium.

### 2.2. DNA extraction and PCR amplification

One replica was used for DNA extraction of total bacteria in the plate. Total bacteria were suspended by



thoroughly washing the agar surface with 5 ml of cold sterile TE<sub>10</sub>, 0.15 M NaCl. The other replica was used for the analysis of individual bacterial colonies. These colonies were picked up individually with toothpicks from the plate and resuspended in 100 µl de TE 1 ×, 0.15 M NaCl. DNA was subsequently extracted from the suspended bacteria as described (Romero et al., 2002).

Both extracted DNA from total bacteria in the plate and the lysates from each colony were PCR amplified and the products analyzed as described (Espejo and Romero, 1997). Briefly, ISR1 was amplified by PCR using 1 ng of DNA and the primers (G1 and L1) under conditions described by Jensen et al. (1993), with the following modifications: 25 cycles were 1.5 min at 98 °C, 1.5 min at 58 °C, and 1.5 min at 72 °C and the one last cycle was at 72 °C for 10 min.

### 2.3. Dendrogram construction

Dendrograms were created using the Treecon for Windows program (Van de Peer and De Wachter, 1994). Genetic distance was calculated based on the number of shared ISR1 between OTU pairs, according to Nei and Li (1979). Clustering was achieved by the weighted pair group method using arithmetic averages (WPGMA).

## 3. Results

### 3.1. Conservation of target sequences in 16S rRNA and 23S rRNA

The main cause of failure to observe ISR1 after PCR amplification seems to be the existence of mismatches between the reverse primer and its target sequences in the 23S rDNA. This target was originally selected from only five bacterial and four plant chloroplast 23S rDNA sequences (Jensen et al., 1993) and may be significantly different in other bacterial groups. When Gürtler and Stanisich (1996) analysed 21 species that represent 8 genera, they noticed that several 23S rDNA sequences showed mismatches in the target site for the reverse primer employed by Jensen et al. (1993). The conservation of this target sequence was explored in the much larger number of 23S rRNA sequences presently available. Analysis of most of the

23S rDNA sequences, available at RDPII, NCBI nucleotides, and NCBI genomes, showed that among 79 species corresponding to 51 genera, 43% would contain two or more mismatches, with at least one located within the five bases next to the 3' of the primer (results not shown). Interesting, while *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus* show perfect match with the primer, other species of the same genus like *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* show nine mismatches. On the other hand, the target for the forward primer seems to be highly conserved: only 76 among 7584 aligned 16S rDNA sequences in the RDPII database (Maidak et al., 2001) show two or more mismatches or at least one within the five bases next to the 3' end.

### 3.2. Assessment of bacterial populations without amplifiable ISR1

Ad hoc samples were analysed to estimate the fraction of the bacterial community that could be missed by PCR amplification of the intergenic spacer region between genes for 16S and 23S rRNA genes. These samples consisted of pairs of replica plates containing about 50 colonies each, obtained by seeding appropriate dilutions of oyster homogenates. One of the replica was used to extract the DNA from the whole sample, as it would be normally performed when employing this method. The other plate was used to extract DNA from each colony (population) separately. The extracted DNAs were then PCR amplified for ISR1 according to Jensen et al. (1993).

Replica plates incubated in aerobic conditions were analysed first. Unexpectedly, each of the 61 colonies in the sample rendered products within the expected size range after PCR amplification. Among these 61 colonies, 22 different OTUs were distinguished according to the size pattern of the spacers obtained after polyacrylamide gel electrophoresis. Fig. 1 shows the dendrogram obtained by clustering the colonies according to their ISR1 pattern. Pattern H was observed in 33 colonies and constituted by far the prevalent type observed in the sample.

Since it was surprising that the ISR1 from every colony was PCR amplified, we explored the possibility that the stringency of the annealing step was allowing amplification in spite of significant mismatches. Low stringency would allow either amplification of ISR1

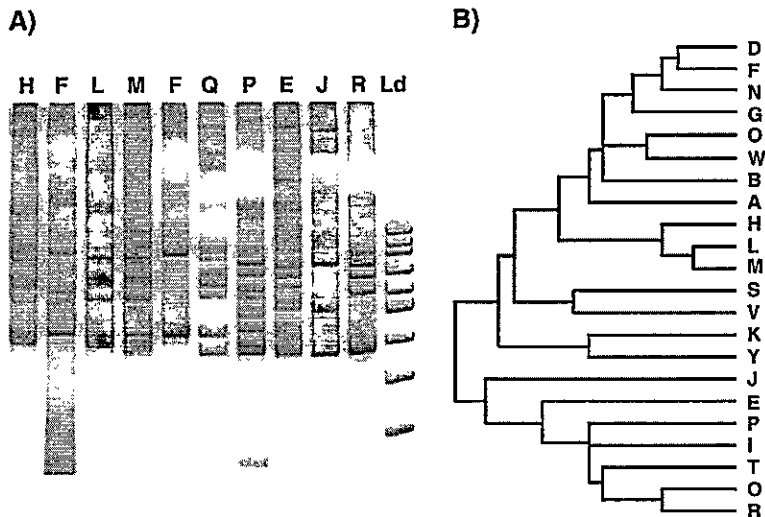


Fig. 1. Bacterial composition observed by the ISR1 pattern obtained after PCR amplification of the colonies grown from oyster homogenates in aerobic conditions. (A) Polyacrylamide gel electrophoresis of the more abundant PCR-amplified ISR1 obtained among the examined colonies. Ld is a 100-bp size ladder. (B) Dendrogram showing the similarity of the ISR1 patterns from every colony in the sample. Letters indicate the OTU at which each colony was assigned.

from *r7n* operons with large number of mismatches or non-specific amplification of other DNA regions. To explore both possibilities, amplifications were performed at increasing annealing stringency. At higher stringency, selective disappearance of those bands derived from targets with significant mismatches would be expected. However, increasing the temperature 1 °C, decreased uniformly the amount of each

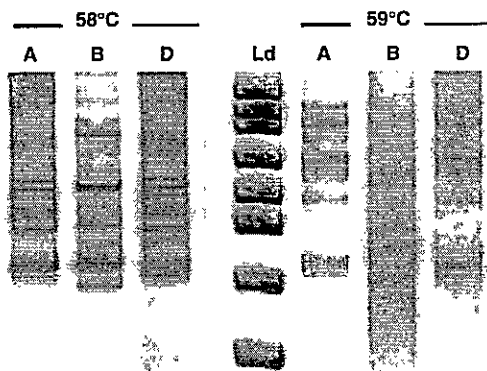


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the ISR1 pattern obtained after PCR amplification at increasing annealing temperature. The colonies employed for amplification corresponded to the OTU indicated on each lane. Ld is a 100-bp size ladder.

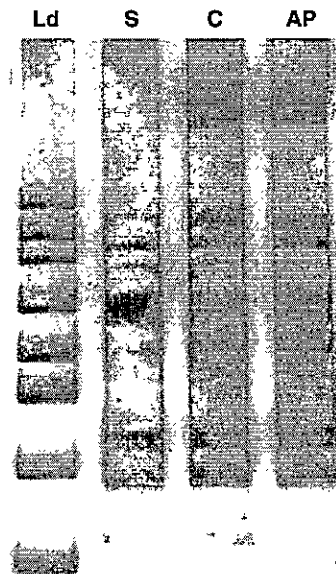


Fig. 3. Comparison of the products obtained after amplification from every colony, individually, or in mixture. Lane AP shows the ISR1 pattern observed in a mixture of the amplification products from each individual colony. Lane S shows the pattern obtained after amplification of the DNA extracted from the whole sample. Lane C corresponds to the product obtained by amplification of a mixture of the DNA extracted independently from each colony. Ld is a 100-bp size ladder.

product. Fig 2 shows an example of amplification at standard temperature (58 °C) and 1 °C higher. This result indicated that the products observed were not generated by a low stringency condition.

3.3. Representation of the different bacterial populations in the PCR amplification product of DNA extracted from the whole sample

Targets with different sizes or sequences can be amplified with different efficiencies (Tajima et al., 2001). The variation in efficiency of amplification may hinder the detection of products from some targets, especially when amplification is performed using a mixture of DNA from different bacterial species. If the ISR1s from some colonies were ampli-

fied with lower efficiency, they would not be observed when using DNA extracted from the whole sample. To explore this possibility, the representation of the ISR1 obtained from single colonies was examined in the product obtained from the whole sample. The ISR1 pattern obtained after amplification of the DNA extracted from the whole sample was compared with the pattern obtained in a mixture of the PCR products from isolated colonies (Fig. 3). Both electrophoretic patterns only showed subtle differences (Fig. 3, lanes S and AP), suggesting that the amplification of the different spacers was not significantly affected by the presence of DNA from different bacterial species. The pattern observed after amplification of a mixture of the DNAs extracted from each colony is also shown in this figure (lane C). Almost every electrophoretic

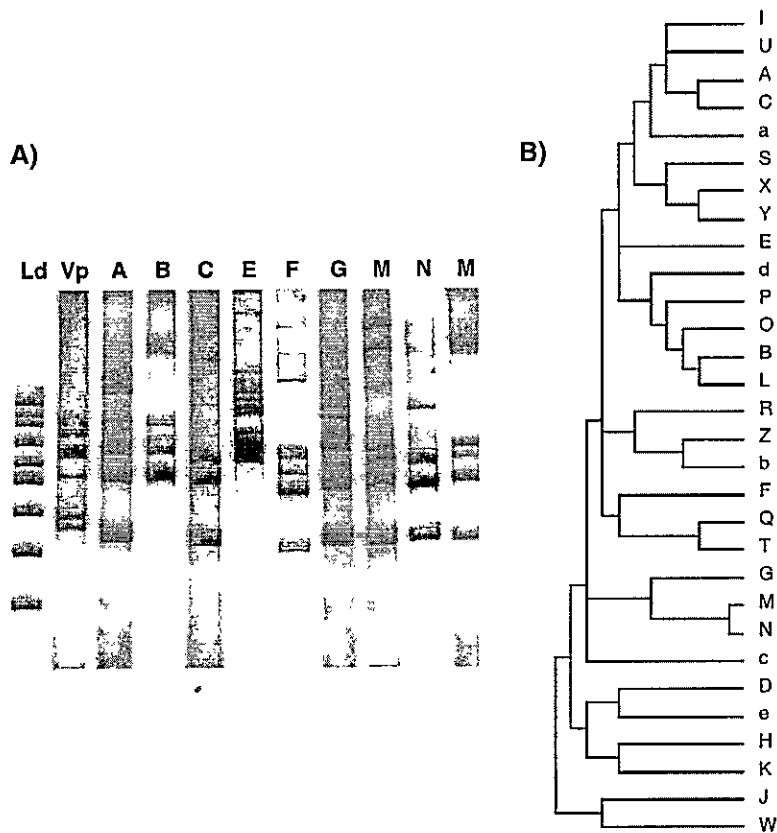


Fig. 4. Bacterial composition observed by the ISR1 pattern obtained after PCR amplification of the colonies grown from oyster homogenates in anaerobic conditions. (A) Polyacrylamide gel electrophoresis of the more abundant PCR-amplified ISR1 obtained among the examined colonies. Ld is a 100-bp size ladder. (B) Dendrogram showing the similarity of the ISR1 patterns from every colony in the sample. Letters indicate the OTU at which each colony was assigned.

band observed in individual colonies was also detected in the amplification product of DNA directly extracted from the sample. However, due to overlapping of many bands in this product, it was not possible to determine if a particular band actually corresponded to that observed after amplification of DNA from a particular colony group. In a particular colony (OTU F), which showed ISR1 bands that did not overlap with any of those corresponding to the rest of the colonies, it could be noticed that their ISR1s were not observed in the amplification product of the DNA extracted from the whole sample. These colonies, which represented close to 10% of the total (5 among 61), would not be observed by the conventional analysis.

To explore if these results were unique to a particular set of bacteria, the same experience was also performed employing a sample of bacteria grown under anaerobic conditions. Similar results were obtained; each of the 37 colonies in this sample rendered products of the expected sizes after PCR amplification for ISR1 (Fig. 4). In this case, however, there was not a large prevalence of a particular OTU and 30 different colonies were distinguished by their ISR1 patterns. The most abundant OTUs were U and M with three colonies each.

#### 4. Discussion

The high abundance in the databases of 23S rDNA sequences showing mismatches between the target and the reverse primer L1 suggested that the ISR1 would not be amplified in a large fraction of the colonies. Our results indicated, however, that failure of amplification of the ISR1 is not frequent in bacterial colonies obtained from oyster homogenates. A preliminary explanation for this observation was that the stringency of annealing condition was too low and allowed annealing of the reverse primer in spite of important mismatches. This was supported by the large number of bands observed in the products obtained with some bacterial colonies, which suggested possible non-specific amplification. However, this explanation was abandoned in view of the results obtained after amplification at more stringent annealing conditions, as explained in the previous section.

The simplest explanation for our observation, that every bacterial colony rendered ISR1 products after

PCR, is that bacterial clades containing mismatches in the target site for L1 primer, as were observed in the databases, were scarce in the samples examined. The actual prevalence of this target in the 23S rDNA of the bacterial clades is difficult to estimate since most of the different bacterial species remain yet to be discovered (Amann et al., 1995). Similar experiments examining samples from other sources could give us some better inference of the abundance of different DNA targets in nature. One limitation of these experiments, however, is that they are restricted to cultivable bacteria.

#### Acknowledgements

We thank Joo Wook Ahn for reviewing the manuscript and correcting the English grammar and style. This work was supported by grant DID from the University of Chile. N. González acknowledges a scholarship from Deutscher Akademischer Austausch Diemst (DAAD).

#### References

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Andersson, S.G., Stothard, D.R., Fuerst, P., Kurland, C.G., 1999. Molecular phylogeny and rearrangement of rRNA genes in *Rickettsia* species. *Mol. Biol. Evol.* 16, 987–995.
- Bensaadi-Merchermek, N., Salvado, J.-C., Cagnon, C., Karama, S., Mouchès, C., 1995. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S–5S rRNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene* 165, 81–86.
- Espejo, R.T., Romero, J., 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1344–1348.
- Fukunaga, M., Mifuchi, I., 1989. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J. Bacteriol.* 171, 5763–5767.
- García-Martínez, J., Acinas, S.G., Anton, A.I., Rodríguez-Valera, F., 1999. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods* 36, 55–64.
- Gürtler, V., Stanisich, V., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N., 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945–952.

- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr., C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29, 173–174.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Nagpal, M.L., Fox, K.F., Fox, A., 1998. Utility of 16S–23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *J. Microbiol. Methods* 33, 211–219.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5269–5273.
- Ojaimi, C., Davidson, B.E., Saint Girons, I., Old, I.G., 1994. Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Microbiology* 140, 2931–2940.
- Romero, J., García-Varela, M., Lacleste, J.P., Espejo, R.T., 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacterial related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microflora (*Tiostrea chilensis*). *Microb. Ecol.* 44, 365–371.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2766–2774.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C., et al., 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 569–570.
- Zhongtang, Y., Mohn, W.W., 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1565–1574.

## Lineage Analysis of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* Strains by Comparison of Their 16S-23S rDNA Spacers

Narjol González<sup>1</sup>, Jaime Romero<sup>1</sup>, Carlos A. Guzmán<sup>2</sup>, and Romilio T. Espejo<sup>1\*</sup>.

Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile<sup>1</sup>, and Vaccine Research Group, Division of Microbiology, GBF-German Research Centre for Biotechnology, Braunschweig, Germany<sup>2</sup>

**Running title:** Lineage Analysis of *V. parahaemolyticus* Strains

\*Corresponding author. Mailing address, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Macul 5540, Santiago, Chile. Phone: (56) 2-6781426, Fax: (56) 2-2214030. E-mail: [respejo@inta.cl](mailto:respejo@inta.cl).

### ABSTRACT

A large number of *Vibrio parahaemolyticus* isolates responsible for a pandemic that started in 1996, corresponds to serotype O3:K6. It is considered that these strains have a clonal origin based on the sharing of several properties, absent in most O3:K6 isolates obtained previous to 1996. *V. parahaemolyticus* strains contain 10-11 rRNA operons enclosing 6-7 different 16S-23S rDNA spacer classes. We show here that every isolate of the pandemic clone analyzed diverge from the species type strain by containing two different 16S-23S rDNA spacer classes. These classes are shorter than the corresponding spacer classes in the species type strain. The sequences of the shorter spacers in the pandemic clones were compared with the corresponding spacers in the species type strain and two other non pandemic strains. One with the pandemic O3:K6 serotype but Kanagawa negative and the other with serotype O4:K12 but Kanagawa positive. The Kanagawa test is closely related with pathogenicity in *V. parahaemolyticus*. In the pandemic strains, the shorter spacer class contains 431 bp and would correspond to the 461 bp observed in the O4:K12 serotype strain after one deletion. In turn, this last spacer corresponds to the 476 bp in the non pandemic O3:K6 strain and this corresponds to the 476 bp spacer in the species type strain after two single mutations. These differences, and also those found in the other shorter spacer, indicate a straightforward lineage for these spacer classes in the following sequence: species type strain > non-pandemic O3:K6 > non pandemic O4:K12 > pandemic clone. According to this sequence of events the ancestor of the pandemic strains might correspond to a non O3:K6 strain and this could explain the large differences of the pandemic strains with O3:K6 isolates obtained before 1996.

Enviado a **Applied and Environmental Microbiology**

**Polymorphism and gene conversion of the 16s rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*.**

Running title: Gene Conversion in *V. parahaemolyticus* *rrn* operons

Subject category: Genes and Genomes

Narjol González, Jaime Romero, and Romilio T. Espejo\*.

Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul, Santiago, Chile.

\*Corresponding author. Mailing address, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Santiago, Chile. Phone: 56-2-6781426, Fax 56-2-2214030, email: [respejo@inta.cl](mailto:respejo@inta.cl).

**ABSTRACT**

Understanding the evolution of the 16S rRNA in *Vibrio parahaemolyticus* is complicated by the presence of 10-11 rRNA operons in the genome of this specie. In this study we describe the polymorphism observed in a particular segment of the 16S rRNA genes among both strains and repeated genes of the genome. This segment, 52 bp long, is located within a highly variable helix of 16S rRNA. Firstly, we show that in some strains this segment is polymorphic between repeated genes of the genome, and secondly that this segment is also highly polymorphic between closely related strains of this species. The species type strain ATCC 17802 contains one or more 16S rRNA genes holding a segment different to that in the other orthologous genes. However, strains belonging to the O3:K6 pandemic clone, responsible of most outbreaks observed throughout the world since 1996 show identical 16S rRNA genes in their 11 operons. Furthermore, in these last strains, the sequence of the variable segment is different to the two sequences found in the species type strain. We also show that in the species type strain there are at least seven rRNA operons with one sequence segment and three with the other, suggesting that a particular segment may propagate to other genes, probably by gene conversion. The rise of a new sequence segment and subsequent gene conversion of the rest of orthologous genes would explain the polymorphism observed between strains of this species. We think that it is likely that the new segment rose by horizontal transfer.

Enviado a **Infection, Genetics and Evolution**

posibilidad para la posesión de genes *rrs* repetidos polimórficos, pudiera ser que en algunas condiciones, uno de los diferentes tipos es resistente a sustancias que actúan a nivel del 16S rRNA, como los amino glucósidos (Recht y col., 1999; Vakulenko y Mobashery, 2003). Estos resultados nos plantean nuevos enigmas que deben ser resueltos, como la velocidad de degradación y/o síntesis de los rRNA en las diferentes condiciones analizadas, principalmente en las que simulen las condiciones ambientales.



## CONCLUSIONES

1. El análisis de la composición bacteriana presente en las diversas muestras pudo ser realizada exitosamente mediante el empleo de las regiones espaciadoras entre los genes 16S-23S rDNA.
2. La cepa tipo de la especie *V. parahaemolyticus* contiene genes 16S rDNA polimórficos y en sus diferentes operones ribosomales encontramos 3 que contienen la secuencia de tipo 2 y 7 operones la del tipo1 y por lo tanto una de ellas se ha transmitido a los otros operones.
3. Ambos tipos de 16S rDNA se expresan y en condiciones de escasez de nutrientes no ocurre una degradación selectiva de uno de ellos.
4. El empleo de las regiones espaciadoras permitió establecer un posible linaje de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

## BIBLIOGRAFIA

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143-169.

Andersson SG, Stothard DR, Fuerst P, Kurland CG. 1999. Molecular phylogeny and rearrangement of rRNA genes in *Rickettsia* species. *Mol Biol Evol* **16**:987-995.

Anton AI, Martinez-Murcia AJ, Rodriguez-Valera F. 1998. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J Mol Evol* **47**:62-72.

Arakawa E, Murase T, Shimada T, Okitsu T, Yamai S, Watanabe H. 1999. Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 clone in Japan. *Jpn J Infect Dis* **52**:246-247.

Arber W. 2000. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**:1-7.

Bensaadi-Merchermek N, Salvado JC, Cagnon C, Karama S, Mouches C. 1995. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S rRNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene* **165**:81-86.

Berg KL, Squires C, Squires CL. 1989. Ribosomal RNA operon anti-termination. Function of leader and spacer region box B-box A sequences and their conservation in diverse micro-organisms. *J Mol Biol* **209**:345-358.

Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury NR, Nishibuchi M, Faruque SM, Sack DA, Takeda Y, Nair GB. 2002. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol* **40**:284-286.

Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, Wang TK, Chao CS. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol* **38**:4621-4625.

Clementino MM, de F, I, Nascimento CR, Branquinho R, Rocha CL, Martins OB. 2001. PCR analyses of tRNA intergenic spacer, 16S-23S internal transcribed spacer, and randomly amplified polymorphic DNA reveal inter- and intraspecific relationships of *Enterobacter cloacae* strains. *J Clin Microbiol* **39**:3865-3870.

Cohen SH, Tang YJ, Silva J, Jr. 2001. Molecular typing methods for the epidemiological identification of *Clostridium difficile* strains. *Expert Rev Mol Diagn* **1**:61-70.

Colquhoun DJ, Alvheim K, Dommarsnes K, Syvertsen C, Sorum H. 2002. Relevance of incubation temperature for *Vibrio salmonicida* vaccine production. *J Appl Microbiol* **92**:1087-1096.

Condon C, Philips J, Fu ZY, Squires C, Squires CL. 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J* **11**:4175-4185.

Condon C, Squires C, Squires CL. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**:623-645.

Conrads G, Claros MC, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam V, Goldstein EJ. 2002. 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:493-499.

Davis BD, Luger SM, Tai PC. 1986. Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **166**:439-445.

DeLong EF. 1992. *Archaea* in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5685-5689.

DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, Cook DW. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol* **66**:4649-4654.

DePaola A, Ulaszek J, Kaysner CA, Tenge BJ, Nordstrom JL, Wells J, Puhr N, Gendel SM. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl Environ Microbiol* **69**:3999-4005.

Deutscher MP. 2003. Degradation of stable RNA in bacteria. *J Biol Chem* **278**:45041-45044.

Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **42**:58-63.

Elder JF, Jr., Turner BJ. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* **70**:297-320.

Espejo RT, Feijoo CG, Romero J, Vasquez M. 1998. PAGE analysis of the heteroduplexes formed between PCR-amplified 16S rRNA genes: estimation of sequence similarity and rDNA complexity. *Microbiology* **144**:1611-1617.

Espejo RT, Romero J. 1997. Bacterial Community in Copper Sulfide Ores Inoculated and Leached with Solution from a Commercial-Scale Copper Leaching Plant. *Appl Environ Microbiol* **63**:1344-1348.

Fogel GB, Collins CR, Li J, Brunk CF. 1999. Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb Ecol* **38**:93-113.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF,

Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Venter JC, . 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**:580-586.

Fukunaga M, Mifuchi I. 1989. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J Bacteriol* **171**:5763-5767.

Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI, Rodriguez-Valera F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J Microbiol Methods* **36**:55-64.

Gong J, Forster RJ, Yu H, Chambers JR, Sabour PM, Wheatcroft R, Chen S. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* **208**:1-7.

Gurtler V. 1999. The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene* **238**:241-252.

Gurtler V, Mayall BC. 1999. rDNA spacer rearrangements and concerted evolution. *Microbiology* **145**:2-3.

Gurtler V, Stanisich VA. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**:3-16.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**:95-98.

Hirvonen CA, Ross W, Wozniak CE, Marasco E, Anthony JR, Aiyar SE, Newburn VH, Gourse RL. 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, Ochi K. 2001. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* **67**:1885-1892.

Iida T, Suthienkul O, Park K, Tang G, Yamamoto K, Ishibashi M, Yamamoto R, Honda T. 1997. Evidence for genetic linkage the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Med Microbiol* **46**:639-645.

Iida T, Hattori A, Tagomori K, Nasu H, Naim R, Honda T. 2001. Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg Infect Dis* **7**:477-478.

Iida T, Makino K, Nasu H, Yokoyama K, Tagomori K, Hattori A, Okuno T, Shinagawa H, Honda T. 2002. Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the *dif*-like site of the host chromosome. *J Bacteriol* **184**:4933-4935.

Iida T, Park KS, Suthienkul O, Kozawa J, Yamaichi Y, Yamamoto K, Honda T. 1998. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* **144**:2517-2523.

Iteman I, Rippka R, Tandeau dM, Herdman M. 2002. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* **148**:481-496.

Jensen MA, Webster JA, Straus N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* **59**:945-952.

Jiang SC, Paul JH. 1998. Gene transfer by transduction in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* **64**:2780-2787.

Jores J, Stephan R, Knabner D, Gelderblom HR, Lewin A. 2003. Isolation of *Vibrio vulnificus* and atypical *Vibrio* from surface water of the Baltic Sea in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **116**:396-400.

Kalpaxis DL, Karahalios P, Papapetropoulou M. 1998. Changes in ribosomal activity of *Escherichia coli* cells during prolonged culture in sea salts medium. *J Bacteriol* **180**:3114-3119.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research* **29**:181-184.

Kramer JG, Singleton FL. 1992. Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl Environ Microbiol* **58**:201-207.