

UCH-FC  
DOC - Microbiología  
B326  
C.1



**Fagos de la cepa pandémica de *Vibrio parahaemolyticus* y sus efectos en el crecimiento y competitividad de la bacteria.**

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**

Por

**Roberto Andrés Bastías Romo**

Director de Tesis

**Dr. Romilio Espejo**

Diciembre, 2010



**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.

**ROBERTO ANDRÉS BASTÍAS ROMO**

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 06, de Octubre de 2010.

**Director de Tesis:**

**Dr. Romilio Espejo**

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dr. Rosalba Lagos**

**Dr. James Robeson**

**Dr. Roberto Vidal**

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....





*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad".*

- Albert Einstein



Soy Roberto Bastías, nací en Santiago el 19 de Diciembre de 1979 y soy el mayor de 3 hermanos. Desde muy pequeño mostré gran interés por la biología y las ciencias en general, lo que me llevó a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, etapa que me acercó definitivamente al mundo de la ciencia. Con el tiempo enfoqué mis intereses en el área de la microbiología lo que se ve reflejado en esta tesis que hoy felizmente concluye después de mucho esfuerzo y trabajo, después de alegrías y frustraciones, pero por sobre todo después de mucho aprendizaje, lo que hoy me permite decir....aún queda mucho por aprender.

En mis ratos libres disfruto de la compañía de amigos, practicando deporte o simplemente con un buen libro.

## AGRADECIMIENTOS



A mi familia por brindarme todo su amor, apoyo y comprensión en estos largos años.

Al Dr. Espejo por su continuo apoyo y especialmente por guiarme en momentos que el rumbo parecía algo confuso.

A Nara y Nello Bossi por su apoyo y ayuda en parte importante de mi tesis.

A los integrantes de la comisión evaluadora por su aporte en el desarrollo de esta tesis.

A todos los integrantes actuales y pasados del grupo de Vibrios por sus continuos aportes y compañía.

A la gente del laboratorio de Biotecnología del INTA por toda la buena onda y hacer más gratas mis horas de trabajo.

Al programa MECE de educación superior proyecto UCH 0407 y al colegio doctoral franco-chileno 2008 por financiar mis años de estudio.

# ÍNDICE DE MATERIAS



	Página
INDICE DE MATERIAS	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	
1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	1
2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Chile.	3
3. Fagos marinos.	5
4. "Carrier state" o pseudolisogenia.	9
5. Efectos de fagos en las poblaciones bacterianas.	10
6. Fagos de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	12
HIPÓTESIS	
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cepas y condiciones de cultivo.	16
2. Aislamiento y crecimiento de fagos.	17
3. Microscopía electrónica de fagos	18
4. Extracción de DNA de fagos y patrón de restricción.	18
5. Amplificación por PCR de DNA polimerasa, RNA polimerasa y Exonucleasa.	20
6. Curvas de crecimiento y ensayo de persistencia de fago.	20
7. Búsqueda de potenciales bacterias lisógenas.	21
8. Infección y persistencia de VP93 en cultivos de <i>V. parahaemolyticus</i> de colonias opacas o translúcidas.	22
9. Modelamiento de dinámica de poblaciones bacterianas y fago VP93.	23
10. Secuenciación de genoma de VP93.	24
11. Conjugación biparental.	25



12. Desarrollo de mutantes.	26
13. Ensayo de sensibilidad a VP93 en cepas no pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	28
14. Curva de competencia entre la cepa pandémica PMC57.5 <i>V. parahaemolyticus</i> y cepas no pandémicas.	29
<b>RESULTADOS</b>	
1. Aislamiento y caracterización de fagos capaces de infectar la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> .	30
1.1. Aislamiento de fagos en pescados y mariscos.	30
1.2. Caracterización general de fagos aislados de <i>V. parahaemolyticus</i> .	31
1.3. Secuencia de genoma de fago VP93.	34
2. Análisis de los efectos de los fagos seleccionados en el crecimiento de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> .	40
2.1. Efecto de fago VP93 en el crecimiento de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> PMC57.5.	40
2.2. Persistencia de VP93 en cultivos infectados de PMC57.5.	41
2.3. Infección y persistencia de VP93 en cultivos de PMC57.5 de colonias opacas o translúcidas.	43
2.4. Modelamiento de la infección de VP93 en cultivos de <i>V. parahaemolyticus</i> compuestos de una fase sensible y una resistente.	45
2.5. Desarrollo de mutante en gen <i>hsdR</i> de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> y estudio de su sensibilidad a VP93.	46
2.6. Efecto de fago KVP40 en el crecimiento de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> PMC57.5.	50
3. Estudio del efecto de los fagos seleccionados en la competitividad de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> con otras cepas de la misma especie.	51
3.1. Efecto de fago VP93 en distintas cepas no pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	51
3.2. Efecto de fago VP93 en un co-cultivo entre la cepa	



pandémica PMC57.5 y la cepa no pandémica PMA112 sensible al fago. 54

3.3. Efecto de fago VP93 en un co-cultivo entre la cepa pandémica PMC57.5 y la cepa no pandémica PMA337 resistente al fago. 57

## DISCUSIÓN

1. Fagos de regiones geográficamente distantes pero estrechamente relacionados.	60
2. Persistencia de VP93 junto a la cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .	64
3. Efecto de fago VP93 en la competitividad de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> con otras cepas no pandémicas. Comparación con efecto de fago VP58.5.	70
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	84



## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Fagos de la cepa pandémica de <i>V. parahaemolyticus</i> aislados.	31
<b>Tabla 2.</b> Potenciales ORFs en genoma de VP93.	37
<b>Tabla 3.</b> Comparación de regiones aminoacídicas de RNA polimerasa tipo T7.	39
<b>Tabla 4.</b> Efecto de fago VP93 en distintas cepas no pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	53

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Microscopía electrónica de fagos de la cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .	32
<b>Figura 2.</b> Patrón de restricción de genomas de fagos de cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .	33
<b>Figura 3.</b> Dendrograma de fagos aislados en base a secuencias de DNA y RNA polimerasa y Exonucleasa.	34
<b>Figura 4.</b> Mapa genómico de fagos VP93 y LKA1.	36
<b>Figura 5.</b> Infección de cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> con el fago VP93	41
<b>Figura 6.</b> Persistencia de VP93 a través de sub-cultivos de la cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .	43
<b>Figura 7.</b> Infección y persistencia de VP93 en cultivos de cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> de colonias opacas o translucidas.	45
<b>Figura 8.</b> Desarrollo de mutante en gen <i>hsdR</i> de cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .	48
<b>Figura 9.</b> Infección de mutante <i>hsdR</i> de cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> con el fago VP93.	49
<b>Figura 10.</b> Infección de la cepa pandémica PMC57.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> con el fago KVP40.	51
<b>Figura 11.</b> Cepas no pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> con mayor sensibilidad al fago VP93.	54

**Figura 12.** Co-cultivo entre cepas de *V. parahaemolyticus* pandémica  
PMC57.5 y no pandémica PMA112 en presencia y ausencia de  
VP93. 56

**Figura 13.** Co-cultivo entre cepas de *V. parahaemolyticus* pandémica  
PMC57.5 y no pandémica PMA337 en presencia y ausencia de  
VP93. 58

## ABREVIATURAS

DGREA:	Análisis directo del genoma con enzimas de restricción.
PFGE:	Electroforesis en gel en campo pulsante.
PMC:	Aislado clínico de Puerto Montt.
PMA:	Aislado ambiental de Puerto Montt.
Pb:	Pares de bases.
Kb:	Kilo bases
ORF:	Marcos de lectura abiertos
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
RFLP:	Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción.
UFC:	Unidades formadoras de colonias.
UFP:	Unidades formadoras de placas.
D.O.:	Densidad Óptica.
MLST:	Tipificación en base a secuencias de múltiples locus.
AP-PCR:	PCR con partidores arbitrarios.
ICTV:	Comité internacional en taxonomía de virus
TCBS:	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

## RESUMEN

*V. parahaemolyticus*, es un bacilo Gram negativo, halófilo, que habita en estuarios y ambientes marinos, y causa miles de casos anuales de gastroenteritis asociados al consumo de mariscos crudos a nivel mundial. Desde 1996, la mayoría de los casos han sido asociados a un mismo clon, conocido como clon pandémico O3:K6. En Chile, hasta la fecha, ha causado más de 16.000 casos causando serios problemas de salud y económicos en las regiones productoras de mariscos. Como la infección por *V. parahaemolyticus* ocurre exclusivamente por el consumo de mariscos que contengan una dosis infecciosa de esta bacteria ( $10^6$  UFC/mL), es de gran interés entender los factores que determinan su abundancia en el litoral. Para esto es necesario conocer su ecología, y uno de los factores más importantes en la ecología de bacterias es la presencia de fagos. Esta tesis explora la abundancia de fagos contra *V. parahaemolyticus* y su efecto en el crecimiento y competitividad de la bacteria.

En este trabajo se aisló y caracterizó 13 podofagos capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, 4 provenientes de México y 7 provenientes del sur de Chile. La secuenciación de los genes de DNA polimerasa, RNA polimerasa y exonucleasa de estos fagos reveló que los 13 fagos están estrechamente relacionados, compartiendo por lo menos un 90 % de identidad a nivel nucleotídico en estos genes. Se seleccionó el fago VP93 para una caracterización más detallada y la secuencia de su genoma

reveló que este grupo de fagos pertenece a un sub-grupo de fagos tipo T7, conocido como grupo  $\Phi$ KMV, que estaba compuesto hasta el aislamiento de VP93 exclusivamente por fagos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados muestran que el fago produce placas de lisis turbias y no afecta notoriamente el crecimiento de la bacteria, incluso utilizando altas multiplicidades de infección, además se observó que estos cultivos presentan entre un 50 y 90% de bacterias naturalmente resistentes. A pesar de esto el fago es capaz de replicarse y persistir junto a la bacteria incluso después de 5 sub-cultivos seriados a una proporción aproximada de un fago por bacteria. La persistencia del fago no se debe a la presencia de bacterias lisogénicas ya que no se encontró rastros de genes del fago en las bacterias resistentes en estos cultivos. Además VP93 pertenece un grupo de fagos líticos sin genes asociados a fagos temperados. Este fenómeno ha sido conocido como "carrier state" o pseudolisogenia y puede ser explicado por la presencia en el cultivo de dos sub-poblaciones, una resistente y otra sensible al fago, ambas a concentraciones similares e intercambiables entre sí a una alta frecuencia similar para ambas direcciones. La continua presencia de estas dos sub-poblaciones podría explicarse por un mecanismo de cambio de fase, donde las bacterias resistentes regeneran a las bacterias sensibles en las que el fago puede continuar replicándose y así persistir en el cultivo.

*V. parahaemolyticus* presenta un cambio de fase reversible apreciable por la existencia de colonias opacas (op) y translúcidas (tr). Sin embargo, los resultados de infección con VP93 en cultivos de bacterias provenientes de colonias opacas o translúcidas sugieren que la resistencia a VP93 no está asociada a este cambio observado. De cualquier modo este hecho no permite descartar que la resistencia al fago esté relacionada con un mecanismo de cambio de fase distinto al mencionado. Intentos por encontrar clones resistentes y sensibles no fueron exitosos, esto podría esperarse si la tasa de intercambio de bacterias sensibles a resistentes y viceversa fuese similar a 0,01 por generación, ya que las colonias tendrían ambos tipos de bacterias, aunque provienen de una sola célula. Esta situación fue modelada utilizando el programa Berkeley Madonna y los resultados arrojados por el modelo se ajustan a los obtenidos experimentalmente. Estos datos sugieren fuertemente que la explicación propuesta sería cierta.

Con el fin de determinar factores que podrían estar involucrados en la resistencia a VP93 se generó una mutante en el gen *hsdR* del sistema de restricción modificación tipo I. Los sistemas de restricción bacterianos participan activamente en la defensa contra fagos e incluso se ha visto que pueden estar regulados por un mecanismo de cambio de fase. Sin embargo, los resultados obtenidos al infectar la mutante generada con VP93, muestran que, al igual que con la cepa silvestre, el fago no afecta notoriamente su crecimiento.

Finalmente se exploró el efecto de VP93 en la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con otras cepas de la misma especie que coexisten en mariscos. Se logró determinar que VP93 es capaz de infectar cerca del 50% de cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* aisladas desde mariscos. Además se observó que al realizar un co-cultivo entre la cepa pandémica PMC57.5 y la cepa no pandémica PMA112 sensible al fago, la presencia de VP93 favorece la prevalencia de la cepa pandémica. En ausencia del fago la cepa PMA112 está presente en una mayor proporción en el cultivo, en cambio, cuando el fago está presente, prevalece la cepa pandémica y la cepa PMA112 es indetectable. Por otro lado, cuando un co-cultivo de la cepa pandémica con una cepa no pandémica que es resistente al fago es infectado con VP93, la proporción de cada cepa es similar a lo observado en co-cultivos no infectados.

Estos resultados sugieren que la interacción entre VP93 y la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* parece ser ventajosa tanto para el fago como la bacteria, ya que, un fago que mate completamente a su hospedero eventualmente no encontraría una célula donde replicarse, mientras que para la bacteria resulta conveniente convivir con un fago que le permita crecer sin mayores problemas. Además la presencia de VP93 representaría una ventaja para la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* porque podría matar otras cepas no pandémicas que estén compitiendo en el mismo hábitat.



## SUMMARY

*V. parahaemolyticus*, a Gram-negative bacillus, halophilic, which lives in estuaries and marine environments causes globally thousands of gastroenteritis cases associated with seafood consumption each year. Since 1996, most cases are associated with a single clone, known as pandemic clone O3:K6. In Chile has caused since 2004 over 16,000 cases with serious health and economic problems in the seafood producing regions. As the infection by *V. parahaemolyticus* occurs exclusively by consumption of shellfish that contain an infectious dose of bacteria, it is of great interest to understand the factors that determine its abundance in the littoral. This aim requires knowledge about the ecology of this bacterium. Being phages one of the most important causes of bacterial death in the ocean, this thesis explored the abundance of phages against *V. parahaemolyticus* and their effect on growth and competitiveness of the bacteria.

In this work 13 podophages capable of infecting pandemic strain of *V. parahaemolyticus* were isolated and characterized, four from Mexico and seven from southern Chile. The sequencing of DNA polymerase, RNA polymerase and Exonuclease genes revealed that all the 13 phages are closely related sharing at least 90% identity at the nucleotide level on these genes. VP93 phage was selected for a detailed characterization and its genome sequence revealed that this group phages belong to a sub-group of

T7-like phages, known as  $\Phi$ KMV group, which contained exclusively *Pseudomonas* phages until VP93 was isolated.

VP93 produces turbid plaques and does not seriously harm pandemic *V. parahaemolyticus* growth, even at high multiplicities of infection. Cultures of the host bacteria contain between 50 and 90% of naturally resistant bacteria. Despite these observations the phage is able to replicate and persist in bacterial cultures even after 5 serial sub-cultures, attaining an approximate constant ratio of one phage per bacterium. The persistence of phage in the cultures is not due to presence of lysogenic bacteria because phage genes were not found in resistant bacteria obtained from these persistently infected cultures. Besides VP93 is part of a lytic phage group not associated with temperate phage genes. This persistence of non temperate phages in bacterial cultures has been known as "carrier state" or pseudolisogeny and in the case of VP93/pandemic strain case was explained by the presence of two sub-populations in the culture, one resistant and another sensitive to the phage, both present at similar concentrations even in clonal cultures, that are interchangeable between them at high similar frequency in both directions. The presence of these two sub-populations in clonal cultures could be explained by a phase change mechanism, where the resistant bacteria can regenerate sensitive bacteria. Phage persisting in bacterial cultures would replicate in the sensitive cells generated at high frequency from the resistant cells.

*V. parahaemolyticus* has a reversible phase change observed by presence of opaque (op) and translucent (tr) colonies. Since cells derived from both colony types are infected by VP93 it is unlikely that resistance to the phage is associated with the op/tra character. However, resistance to phage could be related to another character associated with phase change. Attempts to find sensitive and resistant clones were not successful, this could be expected if the rate of exchange between sensitive to resistant bacteria and vice versa is similar to 0.01 per generation, in this case the colonies would have both types of bacteria even if they come from a single cell. This situation was successfully modeled using the Berkeley Madonna program, suggesting that the proposed explanation for the persistence of phage in the infected bacterial cultures is accurate.

In order to determine genes that may be involved in resistance to VP93 a mutant in the *hsdR* gene from type I restriction-modification system was generated. Bacterial restriction systems are involved in the defense against phages and it has been observed that their expression may be regulated by a phase change mechanism. However, the results obtained by infecting with VP93 the obtained mutants showed that their sensibility to the phage was not different to that of the wild strain.

Finally we studied the effect of VP93 on the competitiveness of the pandemic strain of *V. parahaemolyticus* with other strains of the same species that cohabit in shellfish. VP93 infects nearly 50% of the non-pandemic strains

of *V. parahaemolyticus* isolated from shellfish, some with greater efficiency than the pandemic strain. When a co-culture of the pandemic strain PMC57.5 and the non-pandemic strain PMA112 is infected with VP93, infection favors the prevalence of the pandemic strain. In the absence of phage PMA112 strain is present in a greater proportion of the culture, however, in presence of the phage is the pandemic strain prevails and the PMA112 strain becomes undetectable. Furthermore, when co-cultures of the pandemic strain PMC57.5 with a non-pandemic strain resistant to phage is infected with VP93, the proportion of each strain is not different to that observed in uninfected co-cultures.

These results suggest that the interaction between VP93 and the pandemic strain of *V. parahaemolyticus* could be advantageous for both the phage and the bacteria. By not killing its host VP93 maintain the cells that reproduce it and the bacteria would be provided with a phage that can kill competing strains present in shellfish.

## INTRODUCCIÓN

Hace algunos años se pensaba que el aporte bacteriano en los ciclos de nutrientes era mínimo, sin embargo, gracias a métodos moleculares se descubrió que la cantidad de bacterias en el mar es 100 o 1000 veces mayor a la estimada por métodos de cultivo (Hobbie y col., 1977), lo que otorgó una renovada importancia a los microorganismos marinos. Hoy en día se estima que gran parte de la fijación de carbono en el planeta es realizada por comunidades bacterianas (Strom, 2008). Además, entre las bacterias marinas existen varias que pueden representar un riesgo para la salud humana. Debido a esto, resulta de gran interés entender los factores que pueden afectar la ecología de estas comunidades bacterianas como disponibilidad de nutrientes, temperatura y presencia de fagos, depredadores naturales de las bacterias.

### **1. *Vibrio parahaemolyticus*.**

Entre las bacterias marinas que representan un riesgo para la salud humana se encuentra *V. parahaemolyticus*, un bacilo Gram negativo, halófilo, que habita en estuarios y ambientes marinos. En este hábitat puede asociarse a mariscos, los cuales al ser consumidos crudos o poco cocidos pueden causar diarrea en humanos (DePaola y col., 2000; DePaola y col., 2003;

Hara-Kudo y col., 2003). Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* se producen cuando la concentración de bacterias patógenas alcanza la dosis infectiva en los mariscos consumidos ( $10^6$  UFC/mL).

En 1996 en Calcuta, India, se reportó un gran brote de gastroenteritis causado por *V. parahaemolyticus*, principalmente por bacterias con serovar O3:K6, poco observado anteriormente. Estudios moleculares posteriores indicaron que estas bacterias corresponden a un mismo clon. Desde 1996 este clon ha provocado brotes de diarrea en diferentes países, partiendo en el sudeste Asiático y extendiéndose a América, Europa y África (Bag y col., 1999; Bhuiyan y col., 2002; Martínez-Urtaza y col., 2004).

La naturaleza clonal de los aislados pandémicos de *V. parahaemolyticus* se comprobó por la similitud de los patrones de restricción mediante electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE) (Chowdhury y col., 2000), PCR con partidores arbitrarios (AP-PCR) (Matsumoto y col., 2000), análisis directo del genoma con enzimas de restricción (DGREA) (Fuenzalida y col., 2006), y tipificación en base a secuencias de múltiples locus (MLST) (Chowdhury y col., 2004; Gonzalez-Escalona y col., 2008). Los aislados del clon pandémico se caracterizan por poseer el gen *tdh* y no el gen *trh* (Okuda y col., 1997). Además poseen un marco de lectura abierto *orf8*, asociado a un fago filamentoso (f237) (Nasu y col., 2000), y una secuencia única dentro del operón *toxRS*, llamada *toxRS/new*, que los diferencia de otros aislados de esta especie (Matsumoto y col., 2000). La rápida y masiva expansión del

clon pandémico ha resultado en diversificación con la aparición de variantes bacterianas dentro de este clon (Nair y col., 2007, Chowdhury y col., 2004).

Como todas las bacterias marinas la concentración del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar se ve influenciada por cambios en la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes, presencia de depredadores como protozoos y fagos, y además puede verse afectada por competencia con bacterias que compartan el mismo hábitat (Comeau y col., 2005; Baros y col., 1978).



## **2. *Vibrio parahaemolyticus* en Chile.**

Los registros del Instituto de Salud Pública de Chile indican que desde el año 1992 hasta el 1997 los casos de diarrea asociados al consumo de mariscos reportados eran menores a 20 por año, esto a pesar del alto consumo de mariscos crudos. Sin embargo, estos casos aumentaron enormemente con la llegada de la cepa pandémica O3:K6, originalmente observada en el sudeste asiático (González-Escalona y col., 2005). El primer brote importante se registró en 1998 en la ciudad de Antofagasta, con aproximadamente 300 casos clínicos (Córdova y col., 2002), sin embargo, en esta región no se produjeron más brotes en años posteriores. Los grandes brotes de diarrea asociados al consumo de marisco comenzaron en el año 2004. En el año 2005 los casos reportados por el ministerio de salud

alcanzaron un máximo de 3600 casos en la Región de los Lagos y 10.984 a nivel nacional. Desde esa fecha el número de casos anuales en la Región de los Lagos ha oscilado entre 450 y 1100, mientras que a nivel nacional entre 1500 y 3500 (Olea y col., 2005). Desde el año 2004 se ha realizado un seguimiento a las distintas cepas de *V. parahaemolyticus* presentes en Chile, tanto en casos clínicos como en mariscos. Los estudios se han centrado principalmente en el sur de Chile, en la Región de los Lagos, ya que, en este lugar se produce aproximadamente el 80% de los mariscos consumidos en el país (<http://www.sernapesca.cl>) y existe el consenso de que los mariscos provenientes de esta región causan la mayoría de los casos clínicos de diarreas asociados a *V. parahaemolyticus*.

Hasta antes del año 2007, más del 95% de los casos fueron relacionados al clon pandémico de *V. parahaemolyticus* O3:k6. Ese año se encontraron variantes de este clon pandémico con nuevos serotipos y cerca del 27% de los casos fue causado por cepas no pandémicas (Harth y col., 2009). Sin embargo, el 2008 los casos fueron nuevamente casi exclusivamente debidos al clon pandémico. Los estudios realizados hasta la fecha indican que la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* ha establecido una población relativamente estable en el sur de Chile, pero, con el tiempo han surgido nuevas variantes (García y col., 2009).



### 3. Fagos marinos.

Los fagos marinos son la entidad biológica más abundante del planeta, y se calcula que por cada bacteria, existen 10 fagos (Wommack y Colwel, 2000), alcanzando concentraciones que oscilan entre  $10^7$  a  $10^{11}$  partículas virales/mL de sedimento (Bergh y col., 1989). Con tal abundancia, los fagos serían el mayor reservorio de diversidad genética del planeta. Los fagos son también responsables del 50% de la mortalidad bacteriana en el mar y como gran parte de la fijación del carbono la realizan comunidades bacterianas, tendrían también un efecto importante en el ciclo del carbono (Fuhrman y col., 1999; Wilhelm y col., 1999). Actualmente el "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) define las distintas familias de virus de acuerdo a la naturaleza de su ácido nucleico y a la morfología de la partícula, donde cerca del 96% corresponden a fagos con cola.

El cultivo de fagos marinos requiere contar con un hospedero donde el fago pueda ser replicado, lo que representa una limitación importante si se considera el alto porcentaje de bacterias no cultivables por técnicas estándar existentes en el mar. Otra dificultad en el estudio de los virus, específicamente de sus relaciones filogenéticas, es la ausencia de algún elemento genético que este transversalmente distribuido en los genomas virales que permita estudios de diversidad y evolución (Rohwer y Edwards, 2002). Estas desventajas han sido parcialmente superadas con el desarrollo de diversos estudios de secuenciación de comunidades virales no cultivables

a través la metagenómica. Estos estudios concuerdan con trabajos previos estimando una abundancia viral  $>10^{30}$  y confirman que los virus son el mayor reservorio de diversidad genética en el ambiente, puesto que de todas las secuencias obtenidas cerca del 65% no se parecen a nada previamente descrito en las bases de datos (Breitbart y col., 2002, Angly y col., 2006).

Los fagos tienen diversas formas de influir en las comunidades bacterianas, la más evidente es matando las bacterias a través de sus ciclos reproductivos, pero no siempre la reproducción del fago termina con la bacteria. Existen tres tipos básicos de reproducción de fagos. Infección lítica, crónica y lisogénica. La infección lítica es probablemente la más conocida y estudiada ya que su efecto en los cultivos bacterianos es evidente. En esta situación el fago utiliza al hospedero para producir una numerosa progenie, luego ocurre una lisis celular con liberación de los fagos, que pueden infectar nuevas bacterias repitiendo el ciclo. En la infección crónica, la liberación de la progenie del fago no ocurre por lisis y no es letal para la célula, y ésta puede continuar sus divisiones y liberar fagos por varias generaciones, un ejemplo de esta situación es el fago filamentosos M13 que sale de la célula por extrusión (Russel y Model, 2006). Por último, en el caso de los fagos capaces de seguir la ruta lisogénica, llamados temperados, el ácido nucleico del fago se mantiene en el hospedero como parte del cromosoma bacteriano o como un elemento independiente y se replica junto con éste, hasta que el hospedero es sometido a algún tipo de estrés que gatilla el cambio a una infección lítica (Abedon, 2006). También existe un tipo de infección que aún

no está muy estudiada, esta se conoce como Pseudolisogenia o "carrier state", en la cual el fago puede persistir junto a la bacteria sin lisar por completo el cultivo (Barksdale y Arden 1974, Williamson y col., 2001).

Otra forma en que los fagos pueden influir en la vida de las bacterias es a través de transferencia lateral de genes (transducción). Este fenómeno puede influir enormemente en la diversidad y evolución de sus hospederos (Canchaya y col., 2003; Frost y col., 2005). La transducción puede ocurrir de dos formas, la primera es conocida como transducción generalizada y ocurre como resultado del empaquetamiento inespecífico de material genético celular durante la formación de nuevos fagos. La segunda es conocida como transducción especializada y ocurre cuando un fago se escinde del genoma del hospedero llevando consigo parte del genoma del hospedero adyacente al sitio de inserción. La transducción generalizada puede implicar la transferencia de cualquier gen del genoma del hospedero. Mientras que la transducción especializada está restringida a fagos temperados capaces de integrarse al genoma del hospedero, y en este caso los genes transferidos son siempre los que se encuentran cercanos al sitio de integración en el genoma.

Inicialmente el interés por encontrar fagos transductores se limitaba a su utilización como herramienta de transferencia génica para el estudio de la genética de sus hospederos (Ichige y col., 1989), posteriormente al descubrir la enorme diversidad de virus en el ambiente se comprendió la potencialidad

que éstos tienen de participar directamente en la evolución y diversidad bacteriana como vectores de transferencia lateral. Esto último fue corroborado por los diversos proyectos de secuenciación que han permitido detectar numerosos casos de fagos integrados en genomas bacterianos, a los que se les llama profagos (Canchaya y Col., 2004), quienes usualmente contienen genes que otorgan ventajas selectivas para su hospedero. La presencia de un profago en un genoma bacteriano puede cambiar completamente el fenotipo de una bacteria transformándola en algunos casos en patógena, como es el caso de *V. cholerae*, donde la enterotoxina es codificada por un gen del fago temperado CTX (Waldor y Mekalanos, 1996; Brüssow y col., 2004).

Además de la importancia que los fagos tienen en las comunidades bacterianas, el interés por estudiarlos también ha aumentado debido a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. La fagoterapia es una idea antigua pero que cada vez toma más fuerza como alternativa al tratamiento con antibióticos, cuya aplicación ha sido frenada por la selección de mutantes resistentes y los riesgos de su uso masivo en el ambiente. El conocimiento actual de la reproducción y genética de los fagos también ha permitido superar deficiencias que se presentaron en las etapas iniciales del desarrollo de la fagoterapia. Por otro lado, hoy existen muchos laboratorios utilizando fagos para la expresión de proteínas de fusión para posteriores investigaciones, o incluso para utilizarlos como vectores de vacunas, algunas ya probadas en modelos animales (Clark y col., 2006). Por último,

los fagos podrían tener un papel importante en los brotes infecciosos causados por bacterias patógenas (Faruque y col., 2004).

#### **4. "Carrier state" o pseudolisogenia.**

Desde hace mucho tiempo se han observado fenómenos donde cultivos bacterianos están persistentemente infectados con fagos, a este fenómeno se le llamo "carrier state" y el término se utilizó indistintamente con el de pseudolisogenia, para el cual se han propuesto variadas explicaciones sin llegar a un consenso aún.

Según Barksdale y Arden (1974) una posible explicación para el fenómeno de "carrier state" puede ser la presencia de dos sub-poblaciones bacterianas donde una presenta una resistencia parcial a la infección por poseer menor presencia de receptores. Otra posibilidad es que el número de receptores en la bacteria se vea disminuido por la acción de enzimas del fago como las virolisinas (endolisinas) lo que transformaría bacterias potencialmente sensibles a la infección en bacterias resistentes por la destrucción de sus receptores. En ambos casos existirían dos poblaciones en el cultivo, una resistente al fago y otra sensible que permite que el fago se replique.

## 5. Efecto de fagos en las poblaciones bacterianas.

Existe un amplio consenso en que los fagos son un factor importantísimo en la regulación de la estructura y composición de las comunidades bacterianas en ambientes acuáticos (Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004). De este modo los fagos pueden afectar la competitividad de una determinada bacteria hospedero, de forma positiva o negativa. El efecto negativo obvio es debido a la lisis bacteriana cuando un fago se replica en su hospedero. Si los fagos están presentes pueden infectar una cepa bacteriana determinada pero la probabilidad de colisión entre fagos y bacterias, necesaria para que ocurra la infección, depende de la concentración de la bacteria y su fago (Wiggins y Alexander, 1985). Debido a esto, la infección de fagos afectará preferencialmente la población de la bacteria más abundante, lo que favorecería la diversidad en la comunidad bacteriana, al permitir la coexistencia de bacterias competidoras de distintas especies que de otro modo serían desplazadas por las bacterias de rápido crecimiento, este concepto es conocido como "killing the winner" (Brockhurst y col., 2006).

Los fagos temperados también tienen la potencialidad de provocar una alta lisis bacteriana. La inducción de bacterias lisogenizadas es una de las principales causas de mortalidad en las bacterias marinas y contribuyen a la producción de fagos (Weinbauer y col., 1996). Un estudio realizado en la Bahía de Tampa, Florida, USA, se encontró que el 43% de las bacterias marinas aisladas contienen fagos inducibles (Jiang y Paul, 1994). En otro

trabajo se encontró que el 71% de las bacterias aisladas del Golfo de Trieste estaban lisogenizadas (Stopar y col., 2004). Estos resultados indican que entre las bacterias marinas existe una gran proporción que contienen profagos en sus genomas, los que al ser inducidos, por situaciones de stress generalmente, pueden afectar directamente las dinámicas de una población bacteriana (Bossi y col., 2003).

Como ya se mencionó los fagos también pueden tener un efecto positivo en la competitividad de una bacteria. En este caso los profagos vuelven a jugar un papel importante, ya que, por un lado representan el peligro latente de la lisis bacteriana, pero por otro lado también pueden otorgar ciertas ventajas a sus hospederos. Una característica general de las bacterias que son lisogenizadas es que éstas adquieren inmunidad contra una nueva infección por fagos relacionados. Esta inmunidad puede estar dada por diversos mecanismos como la acumulación del represor del fago al interior del hospedero, o por la supresión de la expresión de receptores del fago en la bacteria (Paul, 2008). Otra característica de los profagos que puede resultar positiva para las bacterias es que comúnmente éstos contienen genes del hospedero en sus genomas. Estos genes podrían contribuir a mejorar el *fitness* de sus hospederos. Un ejemplo de esto ocurre en los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus* que en su conjunto realizan cerca del 25% de la fotosíntesis a nivel global. La secuenciación de fagos capaces de infectar estas bacterias mostró que en sus genomas comúnmente portan genes involucrados en la fotosíntesis (Rohwer y Vega, 2009).

De acuerdo a estas observaciones en general es muy probable que la presencia de fagos capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* afecte significativamente la competitividad de esta bacteria con respecto a otras cepas no pandémicas de la misma especie que compartan el hábitat.

#### **6. Fagos de *Vibrio parahaemolyticus*.**

Hasta el momento se han reportado varios fagos capaces de infectar diferentes cepas de *V. parahaemolyticus*. Estudios sobre la riqueza genética de vibrofagos en ostras y agua de mar han encontrado que se encuentran a concentraciones de  $10^4$ /mL en ostras y a menos de 1/L en agua de mar. La mayoría de los aislados corresponden a *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Comeau y col., 2005; 2006). Algunos de los fagos capaces de infectar *V. parahaemolyticus* han sido caracterizados detalladamente. VpV262 es un fago cuyo genoma de 46,012 Pb ha sido secuenciado y esta distantemente relacionado con T7 (Hardies y col., 2003). El genoma del fago KVP40 también fue secuenciado (Millery col., 2003), este es un fago tipo T4 con un amplio rango de hospedero capaz de infectar incluso bacterias de otro género (Matsuzaki y col., 1992).



Usando Mitomicina C y luz UV como agentes inductores se ha logrado aislar fagos temperados de *V. parahemolyticus* (Ohnishi y Nozu, 1986; Koga y Kawata, 1991), un estudio encontró que 10% de las bacterias aisladas contenía profagos dos de los fagos aislados demostraron tener capacidades transductoras (Muramatsu y Matsumoto, 1991). Hasta la fecha no se han descrito fagos líticos asociados a la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*; solo se han encontrado tres fagos temperados. El fago filamentoso f237 que se encuentra integrado al cromosoma 1 de la mayoría de los aislados del clon pandémico (Nasu y col., 2000; Iida y col., 2001), y otros dos fagos temperados de la familia *myoviridae* que fueron recientemente reportados (Lan y col., 2009; Zabalay col., 2009). Ambos pertenecen a un nuevo grupo de fagos teloméricos. Uno de estos fagos aumenta la sensibilidad de las bacterias lisogenizadas a la luz UV y podría jugar un papel importante en la reducción de la sobrevivencia de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en el océano (Zabala y col., 2009). Los fagos también podrían jugar un papel importante en los brotes de diarrea causados por *V. parahaemolyticus* al disminuir la carga bacteriana presente en los chorritos.

En este trabajo se exploró la presencia y las propiedades de fagos presentes en el mar capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* y se estudió sus efectos en su crecimiento y competitividad con otras cepas de la misma especie. Se encontró un solo grupo de fagos presentes en zonas geográficas muy distantes. Estos fagos pueden replicarse en la cepa

pandémica de *V. parahaemolyticus* sin un efecto evidente en su crecimiento, y pueden co-cultivarse junto a la bacteria sin lisogenizarla, se propone una explicación para este fenómeno. También se presentan resultados que sugieren que el fago podría influir en la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con respecto a otras cepas de la misma especie.

## HIPÓTESIS

La cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* puede ser infectada por fagos ampliamente distribuidos en las costas oceánicas que pueden afectar su crecimiento y competitividad.

### Objetivos.

#### Objetivo General:

Aislar y caracterizar fagos presentes en el mar capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* y determinar sus efectos en el crecimiento y competitividad con otras cepas de la misma especie.

#### Objetivos Específicos:

- 1.- Aislar y caracterizar fagos de mar capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.
- 2.- Determinar los efectos de los fagos seleccionados en el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.
- 3.- Determinar los efectos de los fagos seleccionados en la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con otras cepas de la misma especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas PMC57.5, PMA112 y PMA337 de *V. parahaemolyticus* fueron caracterizadas previamente (Fuenzalida y col., 2006). Las cepas de *V. parahaemolyticus* y fagos fueron crecidos en agua de mar artificial (23.4 g/liter NaCl, 24.7g/litro MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 1.5 g/litro KCl, and 1.43 g/litro CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, pH 6.5) suplementada con 1% de Bacto tryptona (Gifco) y 0,5% de extracto de levadura a 37 °C con agitación constante. En los experimentos de conjugación se utilizo medio TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) como medio selectivo para *Vibrio* manteniendo el resto de las condiciones de crecimiento. Las cepas de *E.coli* SM17-1  $\lambda$ pir (*recA thi pro hsdR-M+* RP4:2-Tc:Mu:Km::Tn7(Tpr Smr)) y CC118  $\lambda$ pir ( $\Delta$ [*ara-leu*]*araD*,  $\Delta$ *lecX74*, *galE*, *galK*, *phoA20*, *thi-1*, *rpsE*, *rpoB*, *argE*[am], *recA1*) (de Lorenzo y Timmis 1994) fueron crecidas en medio LB (1% de Bacto tryptona (Gifco); 0,5% de extracto de levadura y 0,5% NaCl) a 37 °C con agitación constante. Las cantidades de antibióticos para *V. parahaemolyticus* fueron 10  $\mu$ g/mL tetraciclina y 10  $\mu$ g/mL cloranfenicol, y para *E. coli* fueron 100  $\mu$ g/mL ampicilina y 30  $\mu$ g/mL cloranfenicol.

## 2. Aislamiento y crecimiento de fagos.

Los fagos se aislaron de muestras de pescados y mariscos recolectados en aguas costeras del Océano Pacífico de Chile, Región de los Lagos, cerca de Pto. Montt (41°29'S 72°24'O) y Antofagasta (23°39'S 70°24'O), y en México, cerca de Acapulco, Guerrero (16°51'N 99°52'O) y Puerto Progreso, Yucatán (21°18'N 89°39'O). Después de ser recolectadas, las muestras fueron inmediatamente mantenidas en hielo y procesadas en el laboratorio antes de 4 horas. El tejido blando de los mariscos o el tracto digestivo de peces fue macerado y resuspendido en un volumen equivalente de tampón PBS (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.14%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.024%) y posteriormente centrifugado a 5000 x g por 10 minutos. El sobrenadante (100 µL) fue usado para inocular un cultivo en fase exponencial de PMC57.5 (~10<sup>8</sup> células por mL) e incubado toda la noche a 37°C con agitación constante. El cultivo fue luego centrifugado a 5000 x g por 10 minutos y las bacterias remanentes fueron removidas filtrando el sobrenadante en filtros 0,22 µm. Los fagos fueron detectados por el método estándar de doble agar utilizando 100 µL del filtrado. Una placa única fue picada de cada muestra positiva y resembrada dos veces para asegurar un stock clonal de fagos. Para producir fagos, 50 mL de un cultivo de *V. parahaemolyticus* PMC 57.5 (~10<sup>8</sup> células por mL, densidad óptica 0,2-0,3 a 600 nm.) fue infectado a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 e incubado toda la noche. Luego el cultivo fue centrifugado a 5000 x g por 10 minutos y el sobrenadante filtrado (0,22 µm) y

mezclado vigorosamente con 10  $\mu$ L de cloroformo. Alternativamente, la cepa PMA112 fue usada como cepa indicadora.

### **3. Microscopía electrónica de fagos.**

Para la microscopía electrónica, se infectó 50 mL de un cultivo de *V. parahaemolyticus* PMC 57.5 ( $\sim 10^8$  células por mL, densidad óptica 0,2-0,3 a 600 nm.) a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se incubó toda la noche. El cultivo fue centrifugado a 5000 x g por 10 minutos y el sobrenadante filtrado (0,22  $\mu$ m). Esta preparación fue centrifugada a 100,000 x g por 50 minutos y luego el sedimento fue resuspendido en 100  $\mu$ L de agua de mar sintética. Las muestras fueron teñidas con 1% de acetato de uranilo y visualizadas sobre grillas con membranas de formvar cubiertas con carbón usando un microscopio de transmisión electrónica Phillips CM 100. Solo nueve aislados fueron observados: 5090, 5093, 5489, 5312, 5486, 1032, 512, 5e y 2e.

### **4. Extracción de DNA de fagos y patrón de restricción.**

El DNA de los fagos fue extraído de cultivos infectados que fueron centrifugados y filtrados tal como se describe anteriormente, salvo que en este caso los fagos en el filtrado fueron precipitados con polietilenglicol

(PEG-8000) y NaCl a una concentración final de 10% y 1,5M respectivamente. El fago precipitado fue luego centrifugado a 11000 x g por 20 minutos y resuspendido en agua de mar sintética. Para la extracción del DNA, las muestras fueron incubadas con DNasa (2 µg/ml) y RNasa (100 µg/ml) por 1 h a 37°C para eliminar ácidos nucleicos exógenos. Posteriormente estas muestras fueron tratadas con 500 µg/mL de proteinasa K por 15 minutos a 65 °C y posteriormente se agregó Dodecilsulfato de Sodio a una concentración final de 0,5% (peso/volumen). Luego de una incubación a 65 °C por 45 minutos, la solución fue tratada dos veces con fenol-cloroformo. Finalmente, el DNA fue precipitado agregando un volumen 1/10 de Acetato de Sodio 3 M (pH 5,0) y dos volúmenes de etanol absoluto a 20° C. Luego el precipitado fue lavado con etanol 70% y suspendido en tampón TE (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 7.5). El patrón de restricción de los genomas de los fagos fue realizado digiriendo el DNA con la enzima de restricción Hae III (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7,5% durante 2 h a 70 V usando como marcador de peso molecular GenRuler 1kb DNA (Fermentas).

## 5. Amplificación por PCR de DNA polimerasa, RNA polimerasa y Exonucleasa.

La amplificación por PCR de los potenciales genes de DNA polimerasa, RNA polimerasa y Exonucleasa fue realizada utilizando los siguientes oligonucleótidos: TACAGACTATGCCCTGCTG y AGTCTGTGGTGGATGATACC como partidores sentido y antisentido para la DNA polimerasa; CGTCAGTGGTACACAAAGG y GTGCAGCTACGTAATGTGG para RNA polimerasa; y GTTAAGACGTTGCCTACTGC y CATAAGGTAGGCGTATCCAG para exonucleasa. Los partidores fueron diseñados a partir de la secuencia obtenida del genoma de VP93. Las secuencias de los productos de PCR fueron depositadas bajo los siguientes números de acceso FJ896201-FJ896221.

## 6. Curvas de crecimiento y ensayo de persistencia de fago.

La curva de crecimiento en un paso fue realizada infectando un cultivo de *V. parahaemolyticus* PMC57.5 en fase exponencial temprana con el fago correspondiente a un MOI de 10. La absorbancia fue monitoreada y se obtuvo muestras entre cortos intervalos de tiempo para determinar UFP y UFC. Las UFP fueron determinadas después de un tratamiento con cloroformo, para lisar bacterias infectadas, utilizando el método estándar de



doble agar. Las UFC fueron determinadas usando un método de sembrado en placas con agar blando (Berney y col., 2006). La persistencia de los fagos en cultivos infectados fue determinada haciendo diluciones 1/100 de cultivos en fase estacionaria en medio fresco y continuando la incubación. La dilución y subsecuente incubación hasta fase estacionaria fue realizada cuatro veces en serie. La fracción de células resistentes en las suspensiones de colonias bacterianas fue determinada sembrando la suspensión de bacterias de cada colonia en medio sólido en presencia y ausencia del fago. La tasa de adsorción de VP93 fue determinada como describe Mudgal y col. (2006), excepto que el fago libre fue medido luego de una centrifugación en vez de filtrar las muestras.

#### **7. Búsqueda de potenciales bacterias lisógenas.**

La presencia del genoma del fago en bacterias resistentes se determinó buscando los potenciales genes de RNA polimerasa y DNA polimerasa de VP93 en 20 colonias de bacterias resistentes, que fueron previamente sometidas a dos pasajes en medio sólido (re-picadas), para eliminar fago contaminante. Se intentó amplificar los potenciales genes de RNA polimerasa y DNA polimerasa tal como se describió anteriormente. El control positivo para la detección del fago consistió en bacteria mezclada con 0,01 PFU de VP93 por bacteria. El gen *tdh* de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* fue usado como control de la reacción de amplificación. El

tratamiento con Mitomicina C fue realizado agregando una solución fresca de Mitomicina C para obtener una concentración final de 30 ng/mL tal como se ha descrito previamente (Oakey y col., 2000).

#### **8. Infección y persistencia de VP93 en cultivos de *V. parahaemolyticus* de colonias opacas o translúcidas.**

Se aisló una colonia opaca o una colonia translúcida provenientes de un cultivo de PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* y se utilizó para inocular un nuevo cultivo. De este modo se obtuvo cultivos compuestos esencialmente por bacterias que generan colonias opacas (op) o translúcidas (tra) (McCarter, 1998). Los cultivos provenientes de colonias op o tra fueron incubados a 37 °C con agitación constante, en presencia o ausencia de VP93 según corresponda. El fago fue agregado a una multiplicidad de infección de 10. El crecimiento de los cultivos fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm. Los ensayos de persistencia de VP93 fueron realizados haciendo sub-cultivos tal como se describe anteriormente, salvo que el cultivo inicial fue inoculado a partir de una colonia opaca o translúcida según corresponda.

## 9. Modelamiento de dinámica de poblaciones bacterianas y fago VP93.

La dinámica de las poblaciones de bacteria y fago fue modelada como describe Levin y Bull (2004). Con ecuaciones modificadas para adecuarlas a las condiciones deseadas. Los siguientes algoritmos fueron usados con los parámetros indicados.

{Lytic Phage with phase shifting - and mutation to Inherited Resistance with VP93 parameters Initial infection}

{method definition}

METHOD EULER

STARTTIME = 0

STOPTIME = 2.1

DT = 0.0001

DTOUT = 0.01

{Constant Parameters}

v = 2.0 {Maximum growth rate sensitive S}  
v1 = 2.0 {Maximum growth rate resistant R1}  
v2 = 2.0 {Maximum growth rate resistant}  
d1 = 1e-8 {Maximum adsorption rate parameter}  
b1 = 1000 {Burst size}  
k = 0.25 {Monod coefficient}  
e = 5e-7 {Conversion efficiency}  
mutR1S = 1e-2 {Rate at which S cells produced R1}  
mutSR1 = 1e-2 {Rate at which R1 produce S}  
mu = 1e-10 {Mutation rate to resistance S and to NR}  
x = 0.3 {Latent period}  
m = 1e-3 {Rate mortality P1}

{Variables}

init S = 2.3e7 {Initial density of sensitive bacteria}  
init R1 = 2.3e7 {Initial density of phenotypically resistant - phase shift  
bacteria}  
init MS = 0 {Initial density of infected S bacteria}  
init NR = 0 {Initial density of resistant bacteria}  
init P = 1e9 {Initial density of the phage}

init G = 500 {Initial resource}  
 N = S+R1  
 psi = G/(k+G)  
 b = b1\*psi  
 d = d1\*psi

{Delay Variables}

Sx = DELAY(S,x) {Sensitive at t-x}  
 R1x = DELAY(R1,x) {R1 at t-x}  
 MSx = DELAY(MS,x) {S infected with P at t-x}  
 Px = DELAY(P,x) {P1 phage at t-x}

{Equations}

d/dt (G) = - psi\*e\*(S\*v+NR\*v2+R1\*v1)  
 d/dt (S) = (1-mutR1S)\*v\*S\*psi - d\*S\*P + mutSR1\*R1\*psi  
 d/dt (R1) = (1-mutSR1)\*v1\*R1\*psi + mutR1S\*S\*psi  
 d/dt (MS) = d\*S\*P  
 d/dt (NR) = v2\*psi\*NR+GM/dt  
 d/dt (P) = MSx\*b-m\*P

{Mutation}

bm = N\*mu\*DT  
 rm = RANDOM (0, 1)  
 GM = IF rm < bm THEN 1 ELSE 0

Las mismas ecuaciones fueron utilizadas para modelar las diluciones 1/100, excepto que los valores iniciales de P, S y R1 fueron los correspondientes a la dilución 1/100 del cultivo anterior, y el valor correspondiente a STOPTIME fue 16.

## 10. Secuenciación de genoma de VP93.

Para secuenciar el genoma de VP93 primero se generó una genoteca utilizando el kit TOPO Shotgun Subcloning (Invitrogen) siguiendo las

instrucciones del fabricante. Luego a través de MacroGen (Seul, Korea) se secuenció 161 clones usando los partidores M13 sentido y antisentido con lo que se obtuvo 17 contigs. Los espacios entre contigs, terminales repetidos directos y secuencias dudosas fueron determinados o confirmadas por medio de secuenciación directa del genoma de VP93 utilizando los partidores adecuados. Se secuenció 203.655 pb lo que cubre 4,6 veces el genoma del fago. El ensamblaje de secuencias fue desarrollado utilizando el conjunto de programas de libre acceso Staden Package (<http://staden.sourceforge.net/>). La secuencia del genoma fue analizada en busca de potenciales ORFs usando el programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) (Rutherford y col., 2000). Las secuencias traducidas de los ORFs encontrados fueron comparadas con la base de datos de proteínas conocidas utilizando proteína-proteína BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul y col., 1990).

## **11. Conjugación biparental.**

La conjugación fue realizada como describe de Lorenzo y Timmis (1994). Brevemente, la cepa donadora, que contiene el plasmidio a transferir, y la cepa receptora de *V. parahaemolyticus*, fueron incubadas a 37 °C con agitación constante en el medio y antibiótico correspondiente hasta que alcanzaron fase estacionaria. La cepa SM17-1 de *E. coli* fue utilizada en todos los ensayos como cepa donadora. Estos cultivos se utilizaron para

inocular con una dilución 1/100 5mL de medio líquido sin antibióticos, y se incubó a 37 °C con agitación constante hasta una densidad óptica de 0,2 a 600 nm. Posteriormente se transfirió 1 mL de cada cultivo de las cepas parentales a una jeringa de 2 mL y luego la mezcla se pasó a través de un filtro de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de poro. El filtro fue luego depositado sobre una placa LB 0,5% NaCl e incubado a 37 °C por 8-18 h. Luego las bacterias crecidas en el filtro fueron resuspendidas en una solución de sacarosa 0,3 M y se sembraron 50 µL en una placa TCBS suplementada con el antibiótico correspondiente. El medio TCBS es exclusivo para *Vibrios* y la cepa donadora de *E. coli* no puede crecer en él, por otro lado, el antibiótico utilizado impide que crezca *V. parahaemolyticus* a menos que haya recibido el plasmidio transferido. Como control se sembró además cada una de las cepas parentales.

## 12. Desarrollo de mutantes.

Se intentó crear un banco de mutantes de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*. Para generar las mutantes se utilizó el vector pUT mini-Tn5 Tc, que contiene el origen de replicación R6k, que necesita la proteína  $\lambda$ pir para mantenerse en la célula, la región movilizable de RP4 que permite que el plasmidio se transfiera por conjugación, una resistencia a Amp y un mini transposón Tn5 que además contiene una resistencia a Tc (de Lorenzo y Timmis, 1994). Se intentó introducir este vector en la cepa pandémica de

*V. parahaemolyticus* a través de electroporación siguiendo el protocolo de Wang y Griffiths (2008) o por conjugación tal como se explica anteriormente, sin embargo con ninguna de estas dos estrategias se obtuvo transformantes. Como estrategia alternativa se generó una mutante insercional en el gen *hsdR* de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* a través de recombinación homóloga. La región del gen *hsdR* fue amplificada directamente del genoma de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* y los partidores utilizados fueron:

ATATAATAATTAATATAAATCTAGATCTCGAGCCACATCCCAGATCAAGAGT sentido y  
ATATAATAATTAATATAAACTCGAGATCTAGAGCTGGAAGTCGTTGGTCTTA  
antisentido. El amplificado se clonó en el plasmidio pDS132 (Philippe y col., 2004). Este plasmidio contiene el origen de replicación R6K, la región movilizable de RP4 y un gen de resistencia a cloranfenicol.

El clonamiento fue realizado en la cepa CC118 de *E. coli*, luego el plasmidio con el inserto fue purificado y electroporado en la cepa de *E. coli* SM17-1 que fue utilizada como cepa donadora en la conjugación. La conjugación fue realizada tal como se menciona anteriormente. El análisis de posibles mutantes fue realizado mediante PCR utilizando una combinación de partidores diseñados a partir del genoma de *V. parahaemolyticus* y del plasmidio pDS132 (Fig. 8A). La combinación de estos partidores permitió determinar los sitios 5' y 3' donde se inserto el plasmidio, y el sentido en que se inserto. Las secuencias de los partidores diseñados a partir de pDS132 son TTCTGTTGCATGGGCATAAA sentido y TGTGGAATTGTGAGCGGATA antisentido y se les designó los números 3 y 2 respectivamente. Las

secuencias de los partidores diseñados a partir del genoma de *V. parahaemolyticus* son AGCCCTATTTGAGTCGCAGA sentido y CAAAACAATGTGCCAAGCAA antisentido y se les designó los números 1 y 4 respectivamente. Estos mismos partidores fueron utilizados para secuenciar directamente el genoma de la mutante, de este modo se confirmó que el plasmidio se insertó adecuadamente interrumpiendo el gen *hsdR*.

### **13. Ensayo de sensibilidad a VP93 en cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*.**

Para este ensayo se utilizó cultivos de 10 mL de las distintas cepas de *V. parahaemolyticus* crecidos a 37 °C con agitación constante hasta que alcanzaron 0,2 de densidad óptica a 600 nm. Luego 1 mL de cada cepa fue utilizado para hacer un césped bacteriano por el método estándar de doble agar. Una vez que el agar se solidificó se depositó 30 µL de diluciones de una suspensión de fago VP93 y posteriormente se incubó a 37 °C por 3 – 10 h.



**14. Curva de competencia entre la cepa pandémica PMC57.5 *V. parahaemolyticus* y cepas no pandémicas.**

El co-cultivo de las bacterias se inició con una dilución 1/100 de un cultivo en fase estacionaria de cada una de las cepas correspondientes que se incubó a 37 °C con agitación constante. A intervalos de tiempo determinados se tomaron muestras del cultivo para determinar las UFC totales en el cultivo. Para distinguir la cepa que ha generado cada colonia, éstas fueron disueltas en 500 µL de medio de cultivo y hervidas por 10 minutos. 1 µL de cada hervido fue utilizado para realizar un PCR con partidores para los genes *tth*, presente en todas las cepas de *V. parahaemolyticus* utilizadas, y *tdh* presente sólo en la cepa pandémica. Los partidores para *tth* son AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG sentido y GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC antisentido, los partidores para *tdh* son GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC sentido y TGG AATAGAACCTTCATCTTCACC antisentido. Para realizar las experiencias de crecimiento en presencia de fago, se infectó en fase exponencial temprana con una multiplicidad de infección de 10. En las curvas sin fago se agregó un volumen igual de medio de cultivo fresco.

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento y caracterización de fagos capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.

#### 1.1. Aislamiento de fagos en pescados y mariscos.

Se examinó la presencia de fagos capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en muestras de pescados y mariscos provenientes de distintos lugares geográficos. Los fagos fueron enriquecidos por incubación en cultivo líquido de la cepa pandémica PMC57.5 y luego detectados por la formación de placas de lisis en un césped de la misma bacteria. La cepa PMC57.5 es un aislado escogido como cepa tipo de los aislados pandémicos de *V. parahaemolyticus* obtenidos en Chile (Fuenzalida y col., 2006). Se detectó UFP en 13 de 143 muestras analizadas provenientes de diferentes lugares (tabla 1), excepto en las de Antofagasta. Sólo se aisló una placa de lisis por muestra recolectada.

Tabla 1. Fagos de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* aislados

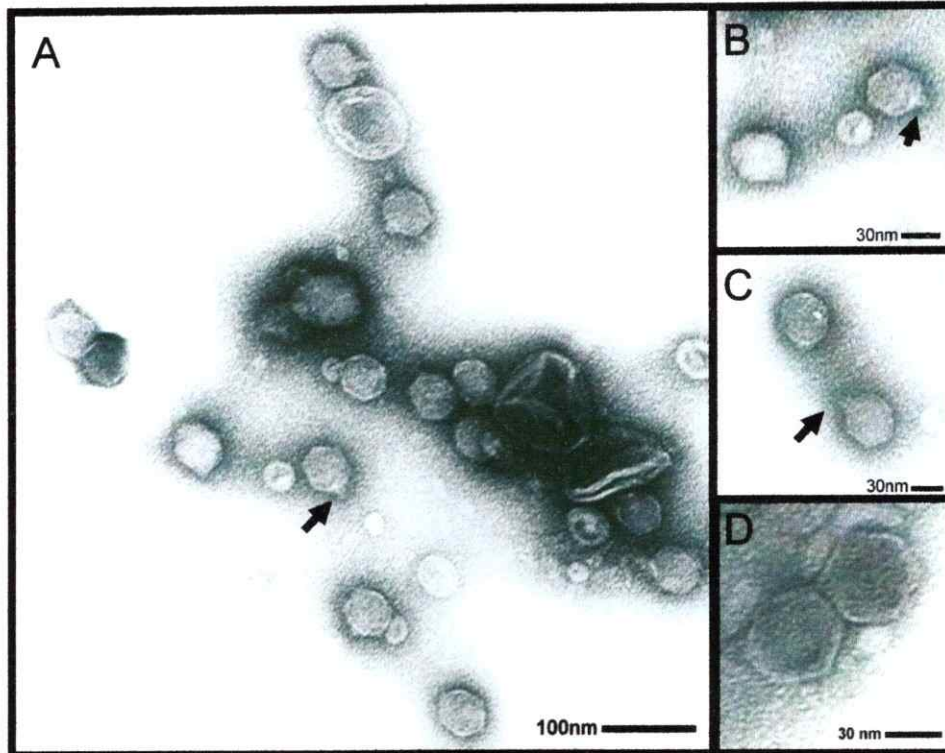
Origen (no. positivas/ no. negativas)	Fago Aislado	Fecha de aislamiento	Muestra	Lugar de recolección	Grupo RFLP
Región de Los Lagos Chile (7/123)	5090	30/8/05	Almejas	Cailín,	D
	5093	30/8/05	Almejas	Yelcho	D
	5489	13/9/05	Almejas	Yelcho	D
	5312	5/9/05	Almejas	Yelcho	A
	5486	13/9/05	Almejas	Isla Chulín,	C
	6119	10/12/05	Almejas	Golfo Ancud	D
	7860	27/12/05	Almejas	Coronel, B-B	D
Puerto Progreso, Mexico (4/6)	5e	8/11/05	Estracto digestivo de peces	Puerto Progreso	B
	2e	8/11/05	Estracto digestivo de Robalo		D
	4e	8/11/05	Estracto digestivo de Mojarra		D
	6e	8/11/05	Ostrasr		E
Acapulco (2/10)	512	24/4/07	Ostrasr	Playa de Acapulco	F
	1032	24/4/07	Almeja chica negra		G

Tabla resumen de los fagos de *V. parahaemolyticus* aislados. Se muestra país de procedencia, fecha y lugar donde fueron obtenidas las muestras y el tipo de muestra utilizada. Las letras indican el grupo al cual pertenece de acuerdo al patrón de restricción del genoma del fago utilizando la enzima *HaeIII*.

## 1.2.-Caracterización general de fagos aislados de *V. parahaemolyticus*.

Los fagos aislados en las distintas muestras fueron crecidos a partir de clones obtenidos de una placa de lisis única, luego parcialmente purificados y caracterizados. Los 13 fagos mostraron idénticas propiedades: resistencia al tratamiento con cloroformo, resistencia de su ácido nucleico a RNAsa, pero sensibilidad a DNAsa y enzimas de restricción. Sus DNAs tienen un tamaño aproximado de 42 Kb de acuerdo a la migración en una electroforesis de campo pulsante. Los nueve aislados observados bajo el microscopio electrónico presentaron la misma morfología de *Podoviridae* o

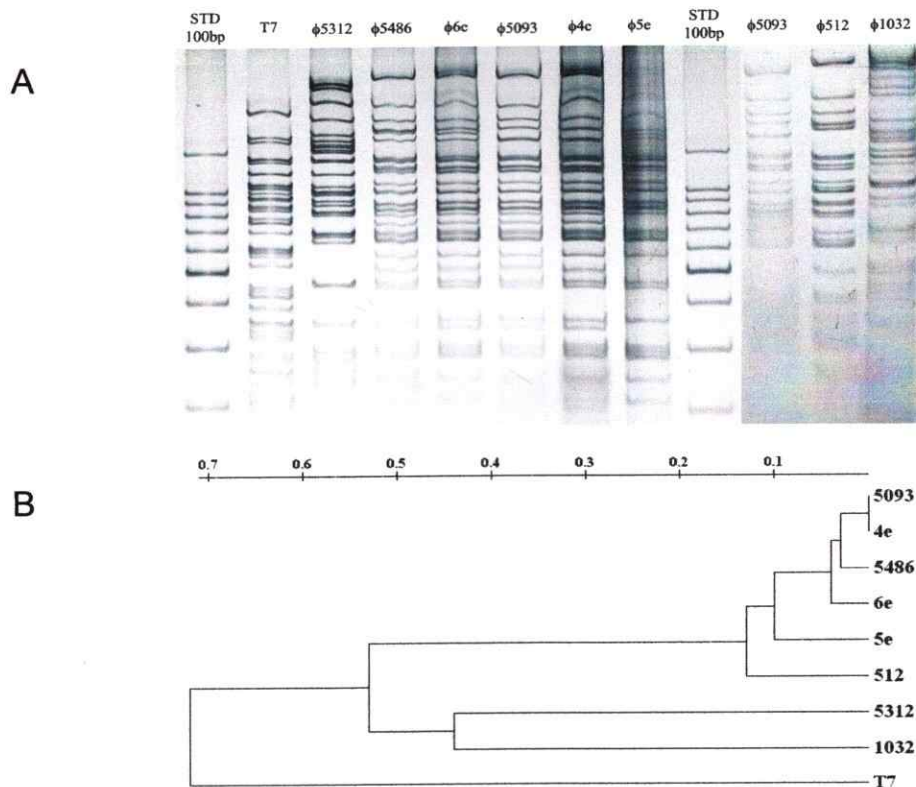
podofagos; una cabeza icosaédrica (de 45 nm de diámetro) con una pequeña cola (de 10 nm de longitud aproximada) (Fig 1).



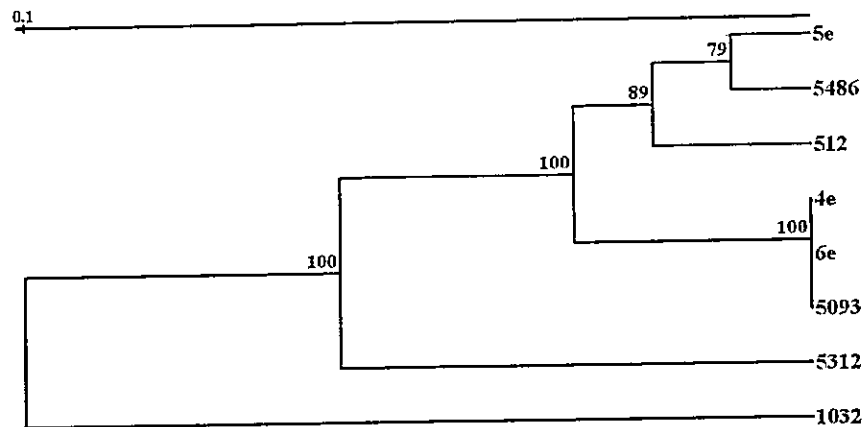
**Figura 1. Microscopia electrónica de fagos de la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.** Tinción negativa con Acetato de Uranilo. Flechas indican las colas de los fagos. Las fotos corresponden a aislado VP93, excepto C y D que corresponden a 5e y 5312 respectivamente.

Los diferentes aislados sólo fueron distinguidos entre sí por el patrón de restricción de sus genomas. De este modo se pudo distinguir 7 grupos utilizando la enzima HaeIII (Fig. 2 y Tabla 1), donde el grupo mayoritario fue el grupo D, compuesto por 7 aislados, algunos provenientes de muestras obtenidas en lugares muy distantes entre sí (por ejemplo el fago 4E proveniente de México y el fago 5093 proveniente de Chile).

Se estudió las relaciones filogenéticas entre los distintos aislados a través de la similitud de las secuencias codificantes para los potenciales genes de DNA polimerasa, RNA polimerasa y de exonucleasa (números de acceso GenBank FJ896201-FJ896221). Los resultados muestran que los fagos pueden ser diferenciados entre sí en los mismos grupos observados con el patrón de restricción de sus genomas, excepto por el fago 6e que forma un grupo junto a los dos únicos fagos pertenecientes al grupo D incluidos en la comparación (Fig 3).



**Figura 2. Patrón de restricción de genomas de fagos de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.** A) Patrón de restricción de los genomas de fagos de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* utilizando la enzima HaeIII. B) Dendrograma de disimilitud que ilustra los grupos formados por el patrón de restricción de los genomas de los fagos. Aislados 5090, 5489, 6119, 7860 y 2e presentan un patrón idéntico a 5093 y 4e, y no fueron incluidos en la figura.

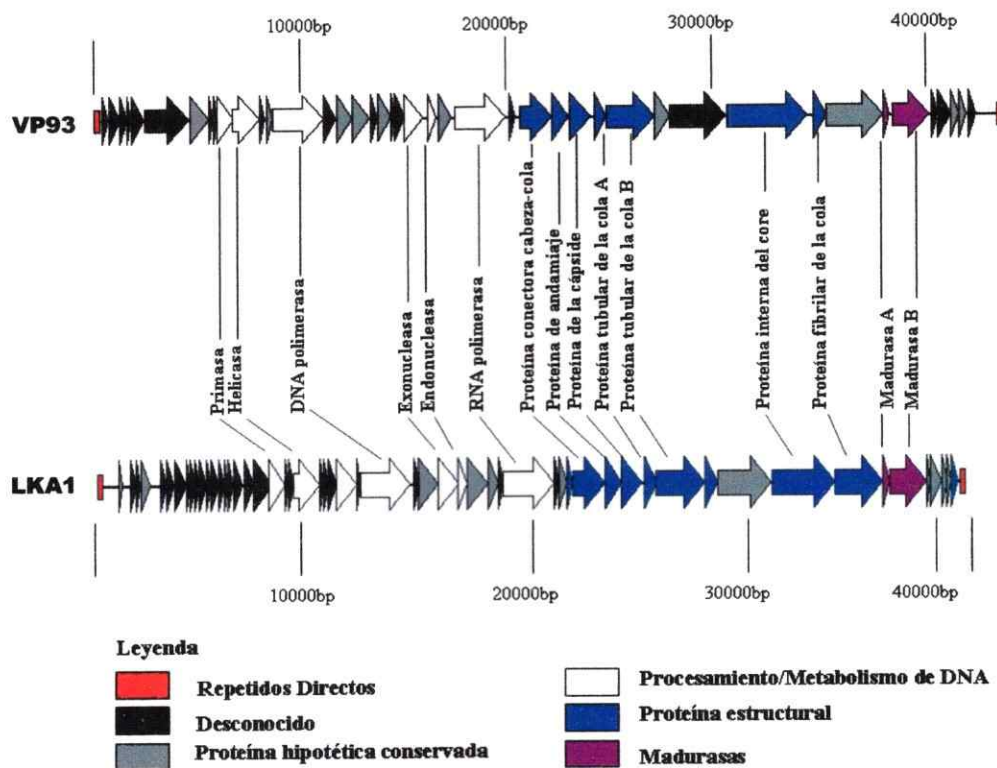


**Figura 3. Dendrograma de fagos aislados en base a secuencias de DNA y RNA polimerasa y Exonucleasa.** Dendrograma de disimilitud que muestra el patrón de grupos obtenidos en base a las secuencias nucleotídicas de amplicones de PCR de potenciales genes de DNA y RNA polimerasa y Exonucleasa. La escala 0,1 corresponde a cambios por posición de nucleótido. La suma de las secuencias comparadas es de 1659 pb y se utilizó un bootstrap de 100

### 1.3. Secuencia de genoma de fago VP93.

El aislado 5093, como representante del grupo mayoritario D, fue seleccionado para una caracterización más detallada y bautizado como VP93. Para continuar con el estudio se secuenció el genoma del fago utilizando una estrategia de "shotgun cloning y primer walking" (Seguritan y col., 2003; Hardies y col., 2003) (Número de acceso GenBank FJ896200). El genoma es de 43931 nucleótidos de largo con un contenido de G + C de 49,2%, 3,8% mayor que el contenido G + C del hospedero (Makino y col., 2003). En los extremos se observó terminales repetidos directos de 337 pb de largo. Estos fueron confirmados por "primer walking", pero el fin de la secuencia no pudo ser exactamente definida debido a la ausencia de un termino claro de las lecturas cuando se secuenció los extremos.

El fago no puede ser asociado a ningún otro grupo de fagos conocidos por la secuencia nucleotídica de su genoma. Sin embargo, de acuerdo al análisis hecho con el programa Artemis (Rutherford y col., 2000), el genoma contiene 44 potenciales ORFs y 16 de estos (39%) codifican para potenciales proteínas que comparten una similitud significativa con proteínas del grupo  $\phi$ KMV, compuesto por los fagos de *Pseudomonas spp.*  $\phi$ KMV, LKD16, LKA1 y LUZ19 (Ceysens y col., 2006). Estos 16 genes corresponden a metabolismo del DNA, proteínas estructurales y maduradas. La organización del genoma también es muy similar a la de los fagos del grupo  $\phi$ KMV (Fig. 4 y tabla 2), éstos contienen 2 regiones genómicas funcionales. La primera (genes tempranos) consta de un grupo de genes de función desconocida probablemente involucrados en la transformación del hospedero, replicación de DNA, y RNA polimerasa. La segunda región (genes tardíos) contiene genes codificantes para proteínas estructurales y posibles proteínas líticas, como glicosil hidrolasa. De acuerdo a esta organización la mayoría de los ORFs no identificados observados en el genoma de VP93 corresponderían por su posición a genes que codifican a proteínas de transformación del hospedero, ubicadas en el inicio de la zona temprana y a proteínas de lisis celular, ubicadas al final de la zona tardía. No se encontró un ORF con similitud a la DNA ligasa, que es un gen común en el grupo  $\phi$ KMV.



**Figura 4. Mapa genómico de fagos VP93 y LKA1.** Los colores fueron asignados de acuerdo a la posible función de cada ORF como se indica en la figura. El mapa de LKA1 fue realizado en base a la secuencia número de acceso AM265639.



Tabla 2. Potenciales ORFs en genoma de VP93.

ORF	Posición	Función predicha	Resultados BLAST relacionados (N° de acceso; E-value)
7	4619-5521	Peptidasa	Proteína hipotética Sala_2518 <i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 (YP_617558.1; 2e-14); Hidrolasa dependiente de metal fago de <i>Thermus</i> (P23-45 YP_001467909.1; 1e-13)
10	5916-6728	Primasa	Primasa fago de <i>Pseudomonas</i> LUZ19 (YP_001671958.1; 3e-18); potencial DNA primasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522861.1; 6e-17)
11	6710-7990	Helicasa	Potencial DNA helicasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522864.1; 2e-85); potencial DNA helicasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522805.1; 1e-70)
13	8349-8654	Proteína hipotética	Proteína hipotética PPLUZ24_gp30 fago de <i>Pseudomonas</i> LUZ24 (YP_001671903.1; 1e-11); proteína 7.7 fago de <i>Yersinia pestis</i> phiA1122 (NP_848293.1; 1e-07)
14	8651-11086	DNA polimerasa	Potencial DNA polimerasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522870.1; 0); DNA polimerasa fago de <i>Pseudomonas</i> LUZ19 (YP_001671963.1; 0)
17	12481-13296	Proteína hipotética	Proteína hipotética PPLKA1_gp31 fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522872.1; 5e-31); Proteína hipotética PPLKD16_gp21 fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522812.1; 3e-29)
19	13687-14316	Proteína hipotética	Proteína hipotética CGSHill_06933 <i>Haemophilus influenzae</i> PittII (ZP_01795538.1; 1e-19); Proteína hipotética fago de <i>Pseudomonas</i> 14-1 (YP_002364358.1; 3e-16)
22	14957-15907	Exonucleasa	Potencial DNA exonucleasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522873.1; 1e-61); potencial exonucleasa fago de <i>Pseudomonas</i> PT2 (YP_002117805.1; 4e-61)
23	16087-16527	Endonucleasa	Potencial DNA endonucleasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522874.1; 9e-28); potencial DNA endonucleasa VII fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522814.1; 2e-25)
24	16643-17227	Proteína hipotética	Proteína de fago de Enterobacteria phiEcoM-GJ1 (YP_001595438.1; 6e-24); proteína unión a ATP fago de Enterobacteria phiEco32 (YP_001671779.1; 8e-20)
25	17413-19863	RNA polimerasa	Potencial RNA polimerasa fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522878.1; 5e-99); potencial RNA polimerasa dependiente de DNA fago de <i>Pseudomonas</i> phiKMV (NP_877465.1; 8e-97)
27	20555-22087	Proteína conectora cabeza-cola	Proteína conectora cabeza-cola fago de <i>Pseudomonas</i> PT2 (YP_002117815.1; 8e-89); potencial proteína conectora cabeza-cola fago de <i>Pseudomonas</i> LUZ19 (YP_001671975.1; 1e-88)
28	22087-22902	Proteína andamiaje	Potencial proteína de andamiaje fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522883.1; 1e-07); Potencial proteína de andamiaje fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522823.1; 3e-06)
29	22967-23965	Proteína de la cápside	Potencial proteína de la cápside <i>Escherichia coli</i> O127:H6 str. E2348/69 (YP_002332050.1; 3e-66); proteína de la capsida fago de <i>Pseudomonas</i> phiKMV (NP_877471.1; 2e-59)
30	24171-24731	Proteína tubular de la cola A	Proteína tubular de la cola A fago de <i>Pseudomonas</i> LUZ19 (YP_001671978.1; 4e-20); Proteína tubular de la cola A fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522825.1; 6e-20)
31	24741-27083	Proteína tubular de la cola B	Proteína tubular de la cola B fago de <i>Pseudomonas</i> phage LKA1Y (YP_001522886.1; 8e-91); Proteína tubular de la cola B fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522826.1; 2e-74)
34	30577-	Proteína interna del	Proteína interna del core fago de <i>Pseudomonas</i> phiKMV

	34431	core	(NP_877476.1; 7e-25); Potencial proteína interna del core fago de <i>Pseudomonas</i> PT5 (YP_002117763.1; 1e-24)
35	34750-35361	Proteína fibrilar de la cola	Potencial proteína fibrilar de la cola fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522830.1; 2e-04); Potencial proteína fibrilar de la cola fago de <i>Pseudomonas</i> PT5 (YP_002117764.1; 3e-04)
36	35370-38102	Glicosil hidrolasa	O-glicosil hidrolasa, proteína familia <i>Acholeplasma laidlawii</i> PG-8A (YP_001621049.1; 1e-23); endo-beta-1,3-1,4 glucanasa <i>Pedobacter</i> sp. BAL39 (ZP_01886294.1; 1e-15)
37	38112-38411	DNA madurasa A	Potencial DNA madurasa A fago de <i>Pseudomonas</i> LKA1 (YP_001522891.1; 1e-07); potencial DNA madurasa A fago de <i>Pseudomonas</i> LKD16 (YP_001522834.1; 2e-04)
38	38536-40341	DNA madurasa B	Potencial DNA madurasa B fago de <i>Pseudomonas</i> PT5 (YP_002117769.1; 8e-145); potencial DNA madurasa B fago de <i>Pseudomonas</i> phiKMV (NP_877482.1; 3e-144)
41	41347-41760	Proteína hipotética (peptidasa)	Gp46 fago de Enterobacteria SP6 (NP_853606.1; 2e-13); peptidasa M15A <i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1 (YP_001111881.1; 4e-13)
42	41753-42121	Proteína hipotética	Proteína hipotética Mext_2445 <i>Methylobacterium extorquens</i> PA1 (YP_001639911.1; 6e-18); Proteína hipotética epsilon15p50 fago de Enterobacteria epsilon15 (YP_850991.1; 4e-16)

BLAST E-values bajo  $10^{-3}$  fueron considerados no significativos. Los siguientes ORFs no entregaron resultados significativos: 1 (42-306), 2 (258-795), 3 (895-1207), 4 (1217-1367), 5 (1447-2029), 6 (2069-4211), 8 (5134-5314), 9 (5369-5534), 12 (7607-7850), 15 (10718-11293), 16 (11302-11895), 18 (12959-13291), 20 (13932-14135), 21 (14145-14570), 26 (19917-20162), 32 (27093-27839), 33 (24357-27455), 39 (40062-40361), 40 (40370-40954), 43 (41855-42187), and 44 (42232-42324).

La proteína RNA polimerasa tiene un alto grado de similitud a la del fago T7 (BLAST E-value 6e-49; 25% identidad), mientras que otras proteínas sólo están relacionadas a las encontradas en el grupo  $\phi$ KMV. La RNA polimerasa de VP93 exhibe además un alto grado de conservación con la de los fagos del grupo  $\phi$ KMV y T7 en la región que rodea los aminoácidos catalíticos esenciales (Lys631, Tyr639, Asp537 y Asp812 (Ceyssens y col., 2006)) (Tabla 3A). Por otro lado, las regiones de reconocimiento y especificidad de esta enzima, que interactúan con los promotores tipo T7 de estos fagos son altamente divergentes de T7 pero comparten cierta similitud con los fagos del grupo  $\phi$ KMV (Tabla 3B)

Tabla 3. Comparación de regiones aminoácidas de RNA polimerasa tipo T7.

**A**

Fago	Secuencia de regiones catalíticas		
	Lys631-Tyr639	Asp537	Asp812
VP93	<b>MTKRPTMTYFYSA</b>	<b>VALDATN</b>	<b>IHDSVA</b>
LKA1	<b>LAKGPVMTYVYGA</b>	<b>IHM DATC</b>	<b>IHDSFG</b>
$\phi$ KMV	<b>LTKKPCMFLVYGT</b>	<b>VHMDATC</b>	<b>IHDSMG</b>
LKD16	<b>LTKKPCMFLVYGT</b>	<b>VHMDATC</b>	<b>IHDSMG</b>
T7	<b>VTKRSVMTLAYGS</b>	<b>LAFDGSC</b>	<b>IHDSFG</b>

**B**

Fago	Región de especificidad	Región de reconocimiento
VP93	NRHETRVKVRSMG - INQVVLYNFDYE	LKASKTR - GVGAKY
LKA1	DFVEHRVKIRSCG - ITDIVVREDLDQ	VVETKAR - GPGAAL
$\phi$ KMV	KTEEVRLRLRAEA - VEYVTLYEAKDE	HQEAKAA - GPAAKL
LKD16	KTEEVRLRLRAEA - VEYVTLYEAKDE	HQEAKAA - GPAAKL
T7	KPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSE	WFEEVKAKR GKRPTA

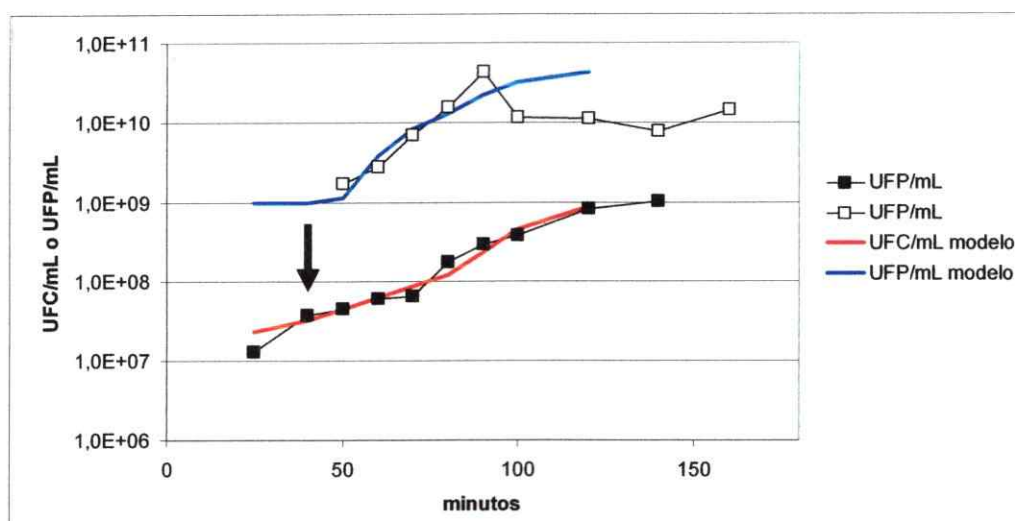
Comparación de las regiones alrededor de aminoácidos catalíticos esenciales (A), de reconocimiento y especificidad (B) entre fago VP93, T7 y fagos del grupo  $\phi$ KMV. Residuos presentes en VP93 se muestran en negrita. Los aminoácidos catalíticos esenciales se muestran subrayados.

## 2. Análisis de los efectos de los fagos seleccionados en el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.

### 2.1. Efecto de fago VP93 en el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* PMC57.5.

El fago VP93 y los otros fagos de los distintos grupos obtenidos por los patrones de restricción, infectaron las diferentes cepas del grupo clonal pandémico de *V. parahaemolyticus* con similar eficiencia. Sin embargo, las placas de lisis observadas luego de titular tanto VP93 como el resto de los fagos aislados fueron consistentemente turbias. Las placas se observan sólo durante un corto periodo de tiempo, entre 2 y 3 horas de incubación, y rápidamente desaparecen al continuar la incubación. Una situación similar ocurre en las infecciones en cultivo líquido. En lugar de una lisis de las bacterias infectadas con aclaración del cultivo, sólo se observa una pequeña disminución en el crecimiento de la bacteria que posteriormente continúa creciendo normalmente. Esta situación ocurre incluso utilizando multiplicidades de infección de 10 UFP por bacteria (Fig. 5). A pesar de que no se observó lisis celular, se determinó una producción de fagos de 100 UFP por bacteria total presente al momento de la infección. Esta situación se mantuvo incluso utilizando una producción de fagos proveniente de una cepa distinta a la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*. El clonamiento sucesivo de la cepa hospedera para superar la posible presencia de bacterias resistentes no produjo resultados distintos a lo observado

anteriormente. Intentos por aislar bacterias sensibles y resistentes a partir de colonias independientes no fueron exitosos. De 300 colonias probadas, ninguna fue significativamente más sensible que el cultivo original. La presencia de una alta proporción de bacterias naturalmente resistentes fue confirmada determinando las UFC en presencia permanente del fago. En esta condición una proporción variable de 50-90% del UFC obtenidas en ausencia del fago fue observada, dependiendo del estado y origen del cultivo.



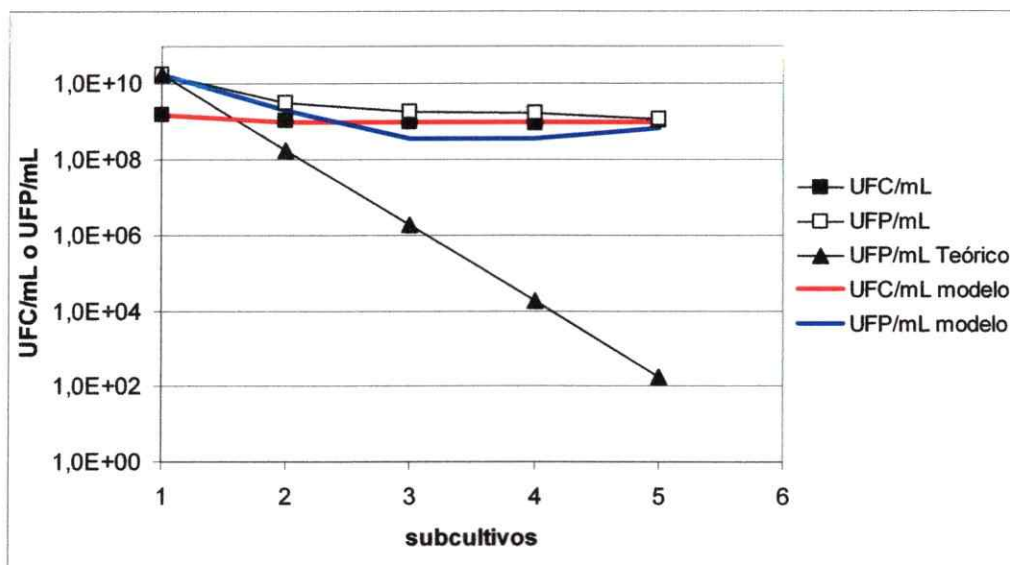
**Figura 5. Infección de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* con el fago VP93.** La cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* fue infectada en fase exponencial con VP93 a un MOI de 10 aproximadamente. La flecha negra indica el momento de infección. El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo UFC y la producción de fago fue monitoreada midiendo las UFP por el método de doble agar. La línea azul y la línea roja indican las UFP y UFC respectivamente, estimadas de acuerdo al modelo basado en la presencia de dos sub-poblaciones bacterianas, una sensible y otra resistente, ambas intercambiables entre sí (Sección 2.4).

## 2.2. Persistencia de VP93 en cultivos infectados de PMC57.5.

El fago VP93 puede replicarse en la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* y al mismo tiempo la bacteria puede seguir creciendo; una

posibilidad es que las bacterias resistentes que encontramos, sean bacterias lisogénicas, sin embargo, ésta fue descartada por la ausencia de genes del fago en bacterias resistentes crecidas luego de la infección con el fago; 20 colonias obtenidas de cultivos infectados y purificadas por 2 cultivos seriados en medio sólido fueron negativas para la amplificación de los genes de RNA polimerasa y DNA polimerasa de VP93 cuando se examinaron por PCR. Adicionalmente el tratamiento con mitomicina C no indujo producción de fago en cultivos provenientes de estas 20 colonias.

Cuando cultivos bacterianos infectados con VP93 fueron cultivados en forma seriada luego de una dilución 1/100 la bacteria creció a la misma velocidad que cultivos no infectados, aunque el fago persistió en el cultivo a 1 UFP por bacteria aproximadamente. El fago se mantuvo junto a la bacteria en el cultivo incluso después de 5 sub-cultivos de diluciones seriadas de 1/100. Esto indica que el fago se reproduce en estos sub-cultivos, de lo contrario desaparecería con las continuas diluciones seriadas (Fig. 6). Esta situación de cultivos permanentemente infectados con un fago ha sido observada anteriormente y se le dio el nombre de "carrier state". Se propone que una de las situaciones que podrían explicar este fenómeno es la existencia de dos poblaciones bacterianas, una sensible y otra resistente (Barksdale y Arden, 1974).



**Figura 6. Persistencia de VP93 a través de sub-cultivos de la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.** Un cultivo infectado de la bacteria fue crecido hasta fase estacionaria (D. O. 1 aprox.) y luego fue diluido 1/100 e incubado nuevamente hasta fase estacionaria en forma seriada para realizar cada sub-cultivo. Las UFC y UFP fueron determinados en la fase estacionaria de cada sub-cultivo. Los triángulos negros representan las UFP esperadas después de cada sub-cultivo si es que el fago no se replica. La línea azul y la línea roja indican las UFP y UFC respectivamente, estimadas de acuerdo al modelo basado en la presencia de dos sub-poblaciones bacterianas, una sensible y otra resistente, ambas intercambiables entre si (Sección 2.4).

### 2.3. Infección y persistencia de VP93 en cultivos de PMC57.5 de colonias opacas o translúcidas.

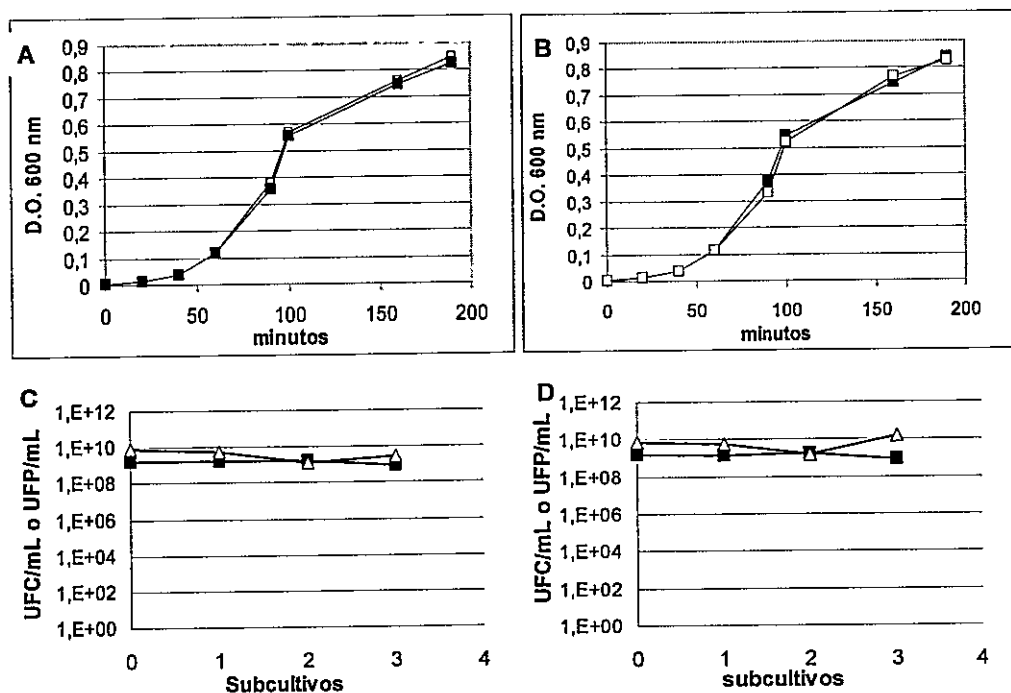
Los resultados del crecimiento de VP93 podrían ser explicados por la existencia de dos tipos celulares, sensibles y resistentes, presentes a concentraciones similares en el cultivo original, incluso en cultivos recientemente inoculados a partir de una colonia. Esta observación podría darse si las bacterias resistentes y sensibles pueden intercambiarse entre si con alta frecuencia y a razones de intercambio similares para ambos casos. Un posible mecanismo para explicar esto es el cambio de fase. Luego de

una infección, las bacterias sensibles producen fago y mueren. Pero el crecimiento de las bacterias resistentes continúa sin verse afectado. Estas bacterias resistentes podrían, sin embargo, generar bacterias sensibles que pueden ser infectadas por el fago, manteniendo el crecimiento de éste y evitando así su dilución a través de los sub-cultivos seriados.

En *V. parahaemolyticus* se ha descrito un cambio de fase evidenciado por la presencia de colonias con morfología opaca (op) y colonias con morfología translúcida (tra) (McCarter y col., 1999). Debido a esto, se exploró la posible relación entre la resistencia al fago y los tipos de colonia op y tra. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas en sensibilidad entre las colonias op y tra; ambas contenían entre un 50% y 90% de bacterias resistentes. Además cultivos a partir de una colonia op o una colonia tra crecen sin problemas al ser infectados con VP93, tal como ocurre con los cultivos originales (Fig. 7 A y B). Del mismo modo se quiso determinar si el fago VP93 es capaz de persistir a través de sub-cultivos originados a partir de una colonia op o tra. Los resultados muestran que el fago puede persistir junto a las bacterias sin importar si el cultivo proviene de una colonia de morfología opaca o translúcida, y se mantiene en ambos cultivos a una proporción aproximada de 1 UFP por UFC, tal como ocurre con los cultivos originales (Fig. 7 C y D). Estos resultados sugieren fuertemente que la resistencia de la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* no está ligada al cambio de fase de colonias opacas y colonias translúcidas, sin



embargo, no descarta que nuestras observaciones estén ligadas a un cambio de fase no ligado a esta morfología de colonia.



**Figura 7. Infección y persistencia de VP93 en cultivos de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* de colonias opacas o translúcidas.** Cultivos a partir de una colonia opaca (A) o translúcida (B) fueron infectados con VP93 en fase exponencial. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por densidad óptica. UFC y UFP observados luego de infección de un cultivo a partir de una colonia opaca (C) o translúcida (D) y posteriores sub-cultivos seriados de diluciones 1/100. Los cuadrados negros representan el cultivo infectado con VP93 y los cuadrados blancos el cultivo sin infectar. Los triángulos blancos representan las UFP

#### 2.4. Modelamiento de la infección de VP93 en cultivos de *V. parahaemolyticus* compuestos de una fase sensible y una resistente.

Suponiendo una situación donde existen dos poblaciones bacterianas una sensible y otra resistente al fago, ambas intercambiables entre sí a alta frecuencia, se puede simular la dinámica de ambas poblaciones junto al

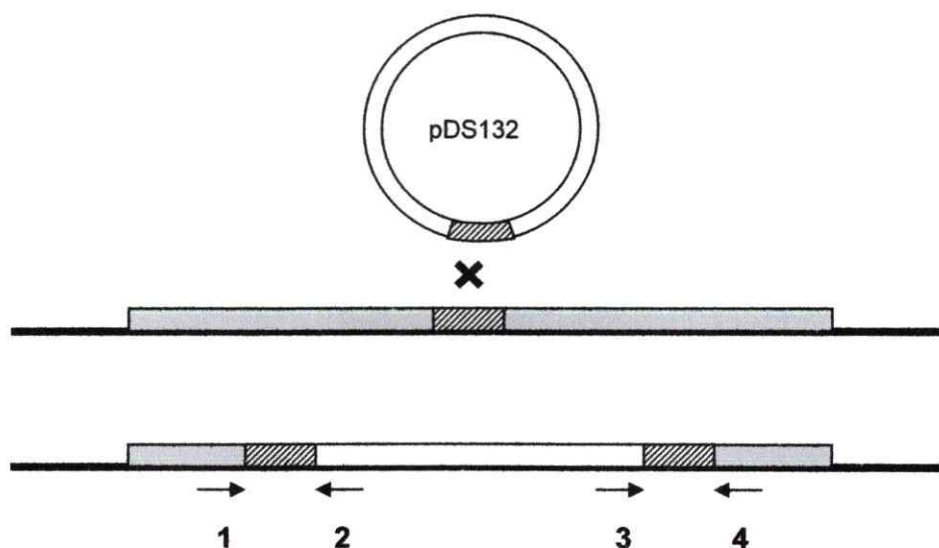
fago. Para esto se utilizó y modificó el modelo creado por Levin y Bull (2004) (Materiales y Métodos) y ayudado por el programa Berkeley Madonna se logró representar la situación de dos poblaciones bacterianas propuesta. Las líneas continuas en las figuras 5 y 6 muestran los valores esperados si VP93 tuviese una tasa de eclosión de 1000 con un periodo latente de 18 min y la bacteria hospedera cambia de sensible a resistente y viceversa a una razón de 0,01 por generación. El modelamiento muestra que un cultivo bacteriano donde ocurra la situación planteada podría explicar los resultados observados en este trabajo donde el fago VP93 es puede persistir junto a la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.

## **2.5. Desarrollo de mutante en gen *hsdR* de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* y estudio de su sensibilidad a VP93.**

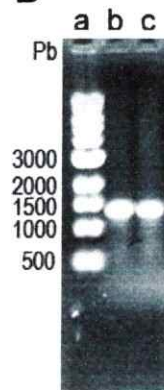
Para entender el mecanismo que permite la coexistencia entre el fago y la bacteria se decidió generar una colección de mutantes aleatorios de la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*. En esta colección se identificarían posteriormente aquellas bacterias con diferente sensibilidad al fago y los genes involucrados en la interacción fago-hospedero. Como primera aproximación se escogió utilizar el plasmidio pUT mini-Tn5 Tc que contiene un mini transposón Tn5, el cual puede integrarse en el genoma bacteriano produciendo mutantes insercionales (de Lorenzo y Timmis, 1994). La introducción de estos plasmidios en la bacteria por electroporación o

conjugación biparental no generó bacterias transformadas. Como estrategia alternativa se decidió generar una mutante en un gen puntual que pudiese participar en la resistencia a fagos. La cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* cuenta, de acuerdo a la secuencia de su genoma, con un potencial sistema de restricción modificación tipo I (Wang y col., 2006), el que como en muchos otros sistemas de restricción bacterianos podría participar en un mecanismo de resistencia a fagos (Labrie y col., 2010). Finalmente se logró inactivar el gen *hsdR* del sistema de restricción modificación bacteriano a través de recombinación homóloga. Para esto se clonó un fragmento de este gen en el plasmidio suicida pDS132, que fue introducido en la bacteria por medio de conjugación biparental. 13 mutantes insercionales fueron obtenidas con esta estrategia y el sitio de inserción fue verificado por PCR y secuenciación de DNA en dos de las mutantes (Fig. 8).

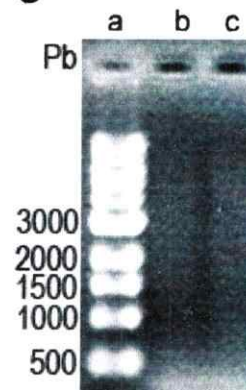
A



B



C



**Figura 8. Desarrollo de mutante en gen *hsdR* de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.** (A) Esquema de cómo se integra el plasmidio en el genoma de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* a través de una recombinación homóloga. El blanco representa el plasmidio pDS132. El gris representa el gen *hsdR* del sistema de restricción-modificación tipo I. La región achurada representa la región del gen *hsdR* clonada en el plasmidio. Las flechas con los números 1-4 representan los partidores diseñados para comprobar el sitio de inserción del plasmidio. (B) PCR de mutantes Vp2 (b) y Vp3 (c) utilizando partidores 1 y 2. (C) PCR de mutantes Vp2 (b) y Vp3 (c) utilizando partidores 1 y 4. Como marcador molecular se utilizó 1kb ladder de Biolabs (a).

Para determinar el posible efecto que la mutación en el gen *hsdR* tiene en la resistencia a VP93, se realizó un cultivo con la cepa mutante y en paralelo otro cultivo con la cepa silvestre. Ambas cepas fueron infectadas con el fago VP93 a una multiplicidad aproximada de 10 fagos por bacteria. En el gráfico de la figura 9 se puede apreciar que las cepas no presentan diferencias ni el crecimiento ni en la producción de fagos. Después de la infección con VP93, se observa una leve disminución en el crecimiento, pero luego ambos cultivos continúan creciendo hasta alcanzar fase estacionaria. Por otro lado la producción de fago aumenta rápidamente 20 min. después de infectar el cultivo superando las  $10^{10}$  UFP/mL. Estos resultados sugieren que el gen *hsdR* y probablemente el sistema de restricción tipo I presente en la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* no participa en el mecanismo de resistencia a VP93 que permite que el fago persista junto a la bacteria.

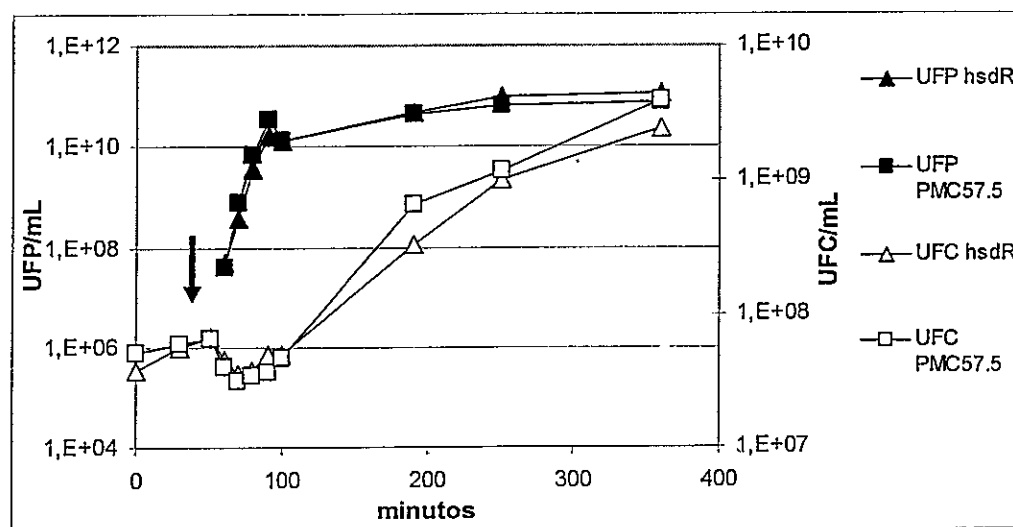


Figura 9. Infección de mutante *hsdR* de cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* con el fago VP93. Cultivos de la cepa mutante *hsdR* y la cepa silvestre fueron infectados en fase exponencial con el fago VP93 a un MOI aproximado de 10. Las UFC y las UFP fueron monitoreadas a través del tiempo. La flecha negra indica el momento de infección con el fago VP93.

## 2.6. Efecto de fago KVP40 en el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* PMC57.5.

Con el objetivo de determinar si la relación observada entre el fago VP93 y la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* es exclusiva para este fago o es una propiedad que también se da con otros fagos, se determinó el efecto del fago KVP40 en el crecimiento de la cepa pandémica. KVP40 es un fago de *V. parahaemolyticus* tipo T4 que tiene un amplio rango de hospedero y es capaz de infectar incluso bacterias de otro género (Matsuzaki y col., 2000). Se infectó un cultivo de la bacteria en fase exponencial temprana con KVP40 a una multiplicidad de infección de 10 (Fig. 10), y se observó que a los pocos minutos de agregar el fago la concentración de la bacteria en el cultivo disminuye bruscamente en aproximadamente dos órdenes de magnitud, mientras que el fago se reproduce y rápidamente alcanza títulos del orden de  $10^9$  UFP/ml. Luego de 2 horas de incubación es posible observar el crecimiento de las bacterias resistentes mientras que la concentración de fagos se mantiene estable. Estos resultados demuestran que KVP40 afecta fuertemente el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, por lo que la interacción observada entre esta bacteria y VP93 no es común para todos los fagos.

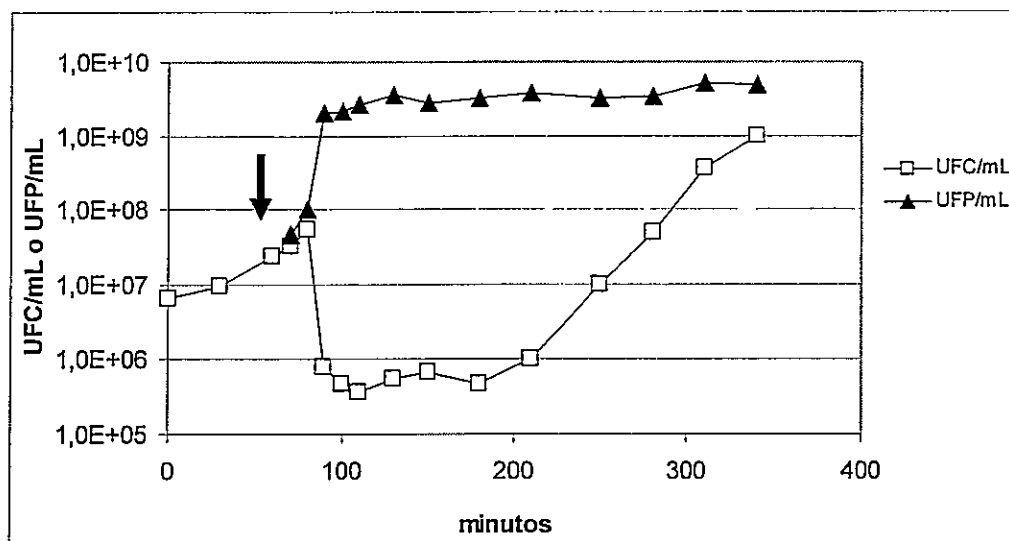


Figura 10. Infección de la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* con el fago KVP40. La cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* fue infectada en fase exponencial con KVP40 a un MOI aproximado de 10. La flecha negra indica el momento de infección. El crecimiento bacteriano fue determinado midiendo UFC y la producción de fago fue monitoreada midiendo las UFP por el método de doble agar.

3. Estudio del efecto de los fagos seleccionados en la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con otras cepas de la misma especie.

3.1. Efecto de fago VP93 en distintas cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

Para determinar el efecto que la presencia del fago VP93 podría tener en la competencia entre la cepa pandémica PMC57.5 con otras cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* lo primero que se investigó fue la sensibilidad a VP93 de distintas cepas no pandémicas de esta bacteria que

se encuentran compartiendo el hábitat (choritos). Este estudio se realizó a través de ensayos de microgota utilizando el fago VP93 y césped bacteriano de distintas cepas de *V. parahaemolyticus* no pandémicas (Tabla 4). Las cepas utilizadas corresponden a aislados provenientes de la zona de Pto. Montt, recolectadas entre los años 2004 y 2009, pertenecientes a distintos grupos DGREA (García y col., 2009; Fuenzalida y col., 2006). Trece de las 28 cepas estudiadas, pertenecientes a cada uno de los grupos DGREA observados hasta el 2009, presentaron sensibilidad al fago VP93, lo que corresponde a 46,4% de las cepas analizadas. El grado de sensibilidad observado para las distintas cepas fue variable de acuerdo a la turbidez de la placa de lisis observada. De este modo se pudieron observar 5 cepas con mayor sensibilidad al fago (placas más claras) en comparación a la cepa pandémica PM57.5, siendo las cepas PMA112, PMA339, PMA189 y PMA18,9 las que presentan mayor sensibilidad (Fig. 11).

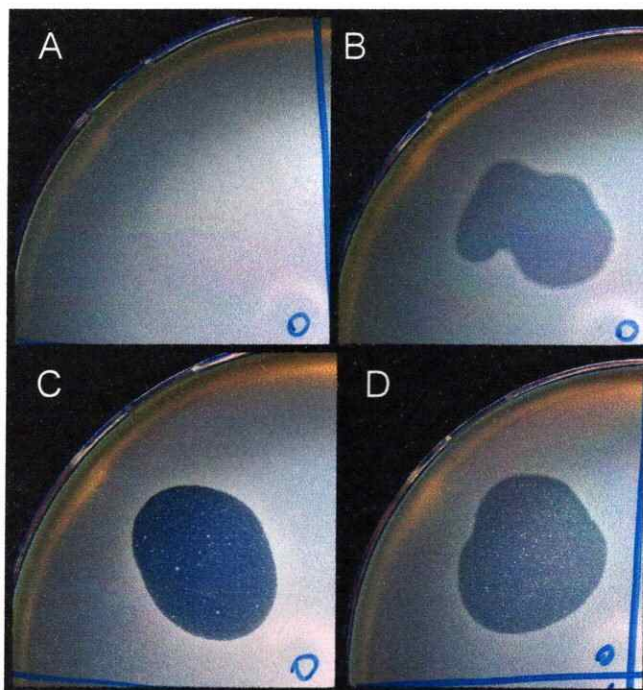
Por otro lado, en 15 cepas definidas como no sensible, fue imposible observar algún tipo de lisis por lo que asumimos que estas cepas son resistentes al fago.



Tabla 4. Efecto de fagos VP93 y VP58.5 en distintas cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

Cepa	Grupo DGREA	Origen	Lugar y año de Aislamiento	Sensibilidad a VP93	Sensibilidad a VP58.5
PMA 3.5	187	Pto. Montt	Pto. Montt 2005	+	-
PMA 45.5	128	Choritos Cultivo La Arena	Pto. Montt 2005	-	-
PMA 112	112	Pto. Montt	Pto. Montt 2004	+++	-
PMA 2.5	118	Choritos Cultivo Quillaípe	Pto. Montt 2005	+	-
PMA 339	339	Pto. Montt (Sesma)	Pto. Montt 2004	+++	-
PMA 16.5	27	Pto. Montt	Pto. Montt 2005	-	-
PMA 337	337	Pto. Montt	Pto. Montt 2004	-	-
PMA 189	189	Pto. Montt	Pto. Montt 2004	+++	-
PMA 79	79	Pto. Montt	Pto. Montt 2004	-	-
PMA 3316	3316	Pto. Montt	Pto. Montt 2005	-	-
VpKX	KX	Humano	Kansai Airport	+	-
PMA 27.5	27,5	Choritos Quillaípe	Pto. Montt 2005	+	-
PMA 19.5	19,5	Choritos Coihuin	Pto. Montt 2005	-	-
PMA 22.5	22,5	Choritos Coihuin	Pto. Montt 2005	-	-
PMA 109.5	109,5	Choritos Quillaípe	Pto. Montt 2005	-	-
PMA 1.5	1,5	Choritos Cultivo La Arena	Pto. Montt 2005	+	-
PMA 13.6	13,6	La Arena	Pto. Montt 2006	-	-
PMA 36.6	36,6	La Arena	Pto. Montt 2006	-	-
PMA 34.6	34,6	La Arena	Pto. Montt 2006	+	-
PMA 40.6	40,6	La Arena	Pto. Montt 2006	+	-
PMA 1.7	1,7	Pto. Montt	Pto. Montt 2007	-	-
PMA 11.7	11,7	Pto. Montt	Pto. Montt 2007	-	-
PMA 21.7	21,7	Pto. Montt	Pto. Montt 2007	-	-
PMA 7.8	7,8	Pto. Montt	Pto. Montt 2008	-	-
PMA 9.8	9,8	Pto. Montt	Pto. Montt 2008	++	-
PMA 25.8	25,8	Pto. Montt	Pto. Montt 2008	+	-
PMA 2.9	2,9	Pto. Montt	Pto. Montt 2009	-	-
PMA 18.9	18,9	Pto. Montt	Pto. Montt 2009	+++	-

Utilizando el método de doble agar y microgotas del fago se determinó la sensibilidad a VP93 de distintas cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*. El grado de sensibilidad se representa por la cantidad de signos +. Signo - indica que no se observó lisis. En la cepa PMC57.5 se observa una sensibilidad correspondiente a "+".



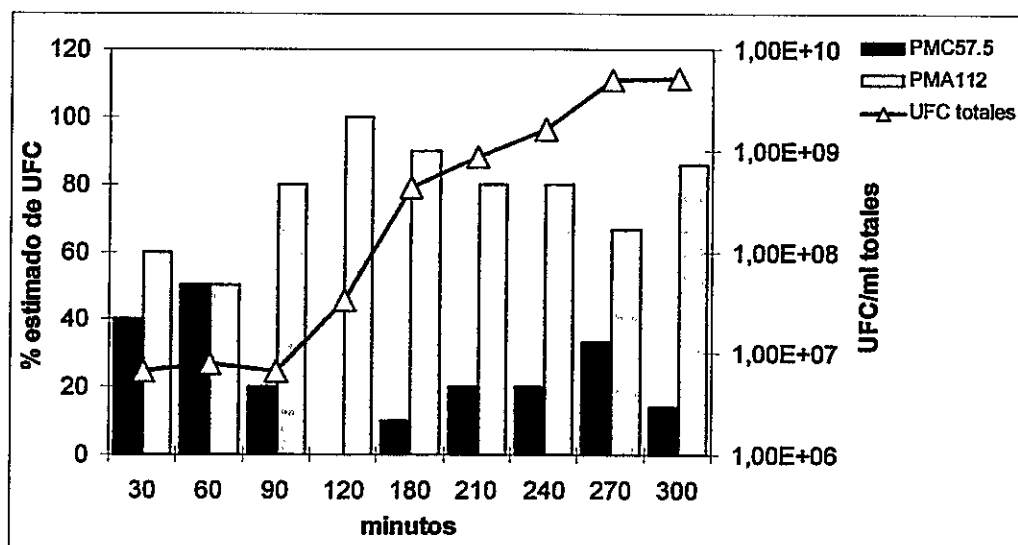
**Figura 11. Cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* con mayor sensibilidad al fago VP93.** Ensayo de microgota con cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* que presentan mayor sensibilidad a fago VP93. (A) cepa pandémica PMC57.5, (B) cepa no pandémica PMA112, (C) cepa no pandémica PMA339, (D) cepa no pandémica PMA189. La cepa PMA 18.9 no fue incluida en la figura.

### **3.2. Efecto de fago VP93 en un co-cultivo entre la cepa pandémica PMC57.5 y la cepa no pandémica PMA112 sensible al fago.**

Después de determinar que el fago VP93 infecta distintas cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* se exploró la posible influencia del fago en la competencia entre la cepa PMC57.5 y otra cepa no pandémica de *V. parahaemolyticus* sensible al fago. Para esto se realizó un co-cultivo mixto entre la cepa PMC57.5 y PMA112, una de las cepas de *V. parahaemolyticus* que presenta mayor sensibilidad a VP93, y se midió su crecimiento en

ausencia y presencia de fago. El crecimiento se midió determinando el número de UFC y para distinguir las UFC de PMC57.5 y PMA112 se realizó PCR de colonia utilizando partidores para amplificar el gen *tth* presente en ambas cepas y el gen *tdh* presente sólo en PMC57.5. El gráfico A de la figura 12 se observa que ambas cepas crecen en co-cultivo pero que la cepa PMA112 crece en mayor proporción que la cepa PMC57.5 abarcando cerca del 80% de las bacterias totales en fase estacionaria. En el gráfico B se muestra el co-cultivo infectado con el fago VP93 a una MOI aproximada de 10. En este caso se observó que PMC57.5, continua creciendo a pesar de la infección con el fago alcanzando una concentración del orden de  $10^9$  UFC/mL que representa el 100% de las UFC observadas en fase estacionaria. Por otro lado PMA112 presenta una disminución en el crecimiento después de la infección con VP93 y no fue detectada después de 2,5 horas de cultivo. Este resultado se debe probablemente a la mayor sensibilidad de la cepa no pandémica PMA112 al fago VP93 y muestra que la presencia de este podría tener un efecto decisivo en una potencial competencia entre estas dos cepas en sus hábitats naturales.

A



B

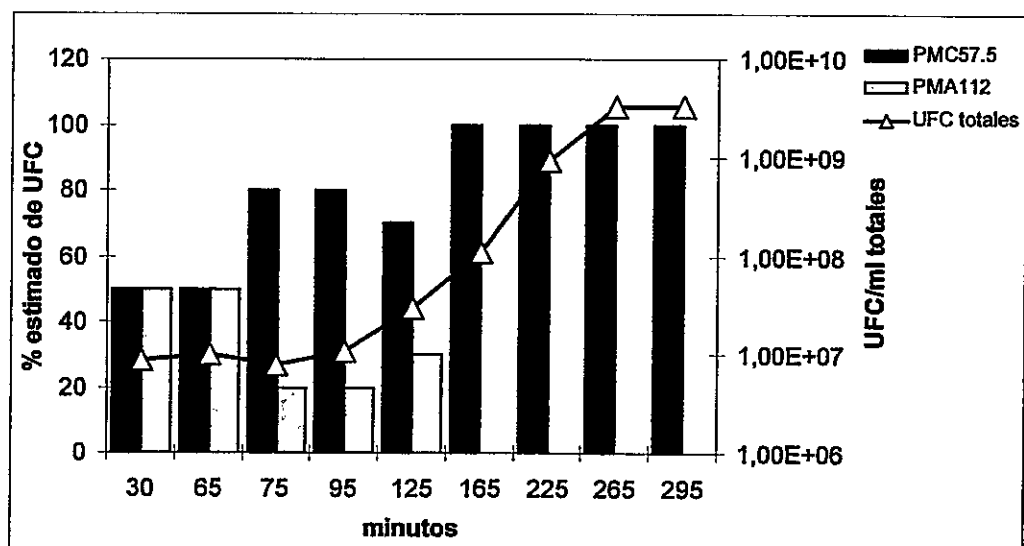
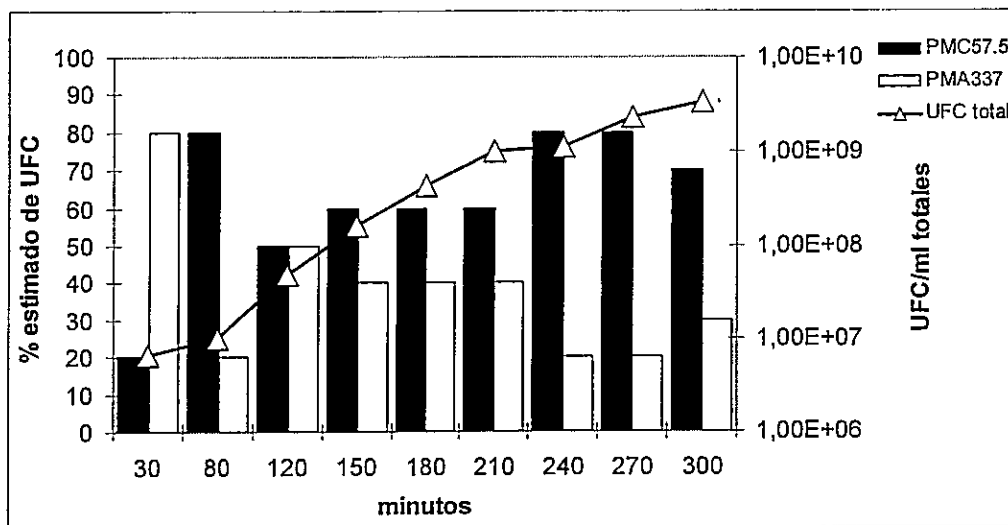


Figura 12. Co-cultivo entre cepas de *V. parahaemolyticus* pandémica PMC57.5 y no pandémica PMA112 en presencia y ausencia de VP93. Co-cultivo entre las cepas PMC57.5 y PMA112 fueron crecidos en presencia (B) y ausencia (A) del fago VP93. Se determinó las UFC totales y se estimó el porcentaje de UFC de PMC57.5 y PMA112 por medio de PCR de colonia. En el co-cultivo en presencia de VP93 la infección fue realizada en fase exponencial temprana con un MOI aproximado de 10, luego del minuto 125 no se detectó la presencia de la cepa PMA112 en ese co-cultivo.

### 3.3. Efecto de fago VP93 en un co-cultivo entre la cepa pandémica PMC57.5 y la cepa no pandémica PMA337 resistente al fago.

Para probar el efecto del fago en una situación contrapuesta, se realizó un co-cultivo de la cepa PMC57.5 con la cepa no pandémica PMA337 (resistente a VP93, Tabla 4) y se midió el crecimiento de ambas en ausencia y presencia del fago como se mencionó anteriormente. En la figura 13 se puede observar que tanto en ausencia (Fig. 13A) como presencia del fago (Fig. 13B) ambas cepas crecen en una proporción similar, alcanzando concentraciones del orden de  $10^9$  UFC/mL en fase estacionaria. Estos resultados muestran que ambas cepas bacterianas prevalecen en forma similar a través del cultivo y que el fago VP93 no representa mayor influencia en este sentido. Además esto refuerza la idea de que la disminución en el crecimiento de la cepa no pandémica de *V. parahaemolyticus* PMA112 es producto de su sensibilidad al fago VP93.

A



B

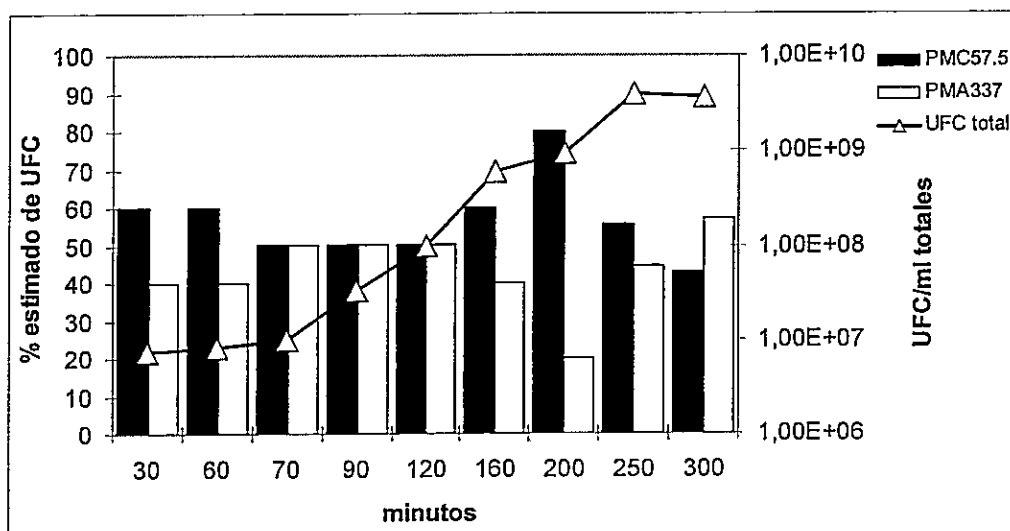


Figura 13. Co-cultivo entre cepas de *V. parahaemolyticus* pandémica PMC57.5 y no pandémica PMA337 en presencia y ausencia de VP93. Co-cultivo entre las cepas PMC57.5 y PMA337 fueron crecidos en presencia (B) y ausencia (A) del fago VP93. Se determinó las UFC totales y se estimó el porcentaje de UFC de PMC57.5 y PMA337 por medio de PCR de colonia. En el co-cultivo en presencia de VP93 la infección fue realizada en fase exponencial temprana con un MOI aproximado de 10.

En su conjunto estos resultados sugieren que la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* PMC57.5 podría verse beneficiada en presencia del fago VP93, ya que, a pesar de ser sensible al fago puede continuar creciendo en un cultivo, mientras que otras cepas no pandémicas pueden ver afectado su crecimiento debido a la sensibilidad a VP93, como es el caso de la cepa PMA112.

## DISCUSIÓN

Este trabajo permitió caracterizar los primeros fagos líticos aislados por enriquecimiento en la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*. Todos los fagos aislados pertenecen al subgrupo  $\Phi$ KMV del grupo T7, compuesto exclusivamente por fagos de *Pseudomonas spp.* Su caracterización demostró que pueden convivir con la bacteria sin afectar notoriamente su crecimiento ni lisogenizar las células. La capacidad de la cepa pandémica de convivir con estos fagos podría aumentar su efectividad en la competencia que debe mantener en los hábitats marinos con otras cepas bacterianas, muchas de su misma especie. Esta capacidad podría, en parte, explicar su persistencia en el mar, lo que ha causado desde 1996 decenas de miles de casos de diarrea en todo el mundo.

### **1. Fagos de regiones geográficamente distantes pero estrechamente relacionados.**

En este trabajo los 13 fagos aislados correspondieron a podofagos capaces de infectar la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*. 6 provenientes de México y 7 provenientes del sur de Chile. La secuenciación de los genes de DNA polimerasa, RNA polimerasa y exonucleasa reveló que los 13 fagos están estrechamente relacionados compartiendo por lo menos un 90 % de identidad a nivel nucleotídico (Fig. 3). Este análisis agrupa los distintos fagos



de forma similar a lo observado con el patrón de restricción de sus genomas (Fig. 2), donde los fagos 5312 y 1032 aparecen como los más distantes, pero además, gracias a su mayor sensibilidad, reveló la estrecha relación entre los fagos mexicanos 4e y 6e con el fago chileno VP93 (5093).

La comparación de la secuencia del genoma del fago VP93 con los datos disponibles permitió determinar que este grupo de fagos pertenece a un subgrupo de fagos tipo T7, conocido como grupo  $\Phi$ KMV, que estaba compuesto hasta el aislamiento de VP93 exclusivamente por fagos de *Pseudomonas spp.* La principal característica de estos fagos es la posición en el genoma del gen de la RNA polimerasa (Ceysens y col., 2006). En los fagos tipo T7 el gen de la RNA polimerasa se encuentra cercano al sitio de inicio de la transcripción, mientras que en los fagos del grupo  $\Phi$ KMV se encuentra inmediatamente después de los genes que participan en el metabolismo del DNA (Fig. 4). Esto sugiere que la RNA polimerasa del hospedero jugaría un papel mucho más importante que en el caso de los fagos tipo T7 clásicos, ya que debería transcribir la mayor parte del genoma.

También es interesante considerar porqué se aisló un sólo tipo de fago. Esto probablemente esté relacionado con la metodología utilizada para aislar y detectar los fagos, que se basa en el enriquecimiento de los fagos en un cultivo de la bacteria hospedera. De este modo en cada muestra analizada, sólo los fagos capaces de infectar la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus* serían capaces de replicarse en el cultivo y posteriormente

ser detectados (Materiales y Métodos). En todas las muestras analizadas en este trabajo sólo se observó un tipo de placa de lisis. Considerando esto, el hecho de que sólo hayamos detectado un tipo de fagos puede deberse a dos motivos, a que los fagos detectados eran los únicos presentes en las muestras analizadas, o a que los otros fagos presentes en las muestras, capaces de replicarse en la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, lo hacían con menor eficiencia que los fagos aislados, por lo tanto no fueron detectados, al constituir solo una pequeña fracción del total de la población de fagos. Es interesante que no se haya detectado el fago KVP40 en este trabajo. Este es un fago de amplio rango de hospedero que infecta *V. parahaemolyticus* (Matsuzaki y col., 1992). De acuerdo a los resultados obtenidos este fago también infecta la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* generando pequeñas placas de lisis claras en medio sólido y una lisis notoria en cultivos líquidos (Fig. 10).

Otra pregunta que surge con estos resultados es si los fagos encontrados llegaron a esos lugares junto con la diseminación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* o estaban ahí desde antes. La explicación más difundida para la diseminación de esta bacteria es que fue a través de aguas de lastre de barcos que recorren las rutas oceánicas, aunque para el caso particular de Sudamérica, hay trabajos que relacionan la emergencia de la cepa pandémica con el fenómeno de "el niño" (Martinez-Urtaza y col., 2008). En ambos casos el fago pudo diseminarse junto a la bacteria.

La otra opción es que los fagos ya estuviesen ahí antes de que llegase la cepa pandémica. Para que esto sea posible los fagos debieron replicarse en otras cepas de *V. parahaemolyticus*. Esto puede ser posible ya que en este trabajo se determinó que el fago VP93 es capaz de infectar otras cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* (Tabla 4). Si se compara las secuencias de los tres genes utilizados para establecer relaciones filogenéticas entre los fagos, se observa que VP93 y 6e (Fig. 3), de Chile y México respectivamente, sólo tienen dos bases diferentes. Siguiendo estimaciones hechas por Breitbart y Rohwer (2005), y suponiendo en este caso una tasa de eclosión de 1000 y una vida media para los fagos de 48 h, entonces un fago debería replicarse exitosamente por lo menos una vez cada 20 días para no desaparecer, ya que pasado ese tiempo se habrían inactivado todos los fagos, por lo que anualmente deberían ocurrir por lo menos 18 eventos de replicación. Si además consideramos que la tasa de mutación para un genoma de doble hebra del tamaño de este fago es de aproximadamente  $10^{-7}$  por base y por generación (Drake, 1999), entonces la probabilidad de que en un año se genere un cambio en una base en las secuencias comparadas sería de  $3 \times 10^{-3}$  y para que se genere la diferencia en dos bases observada entre los fagos VP93 y 6e se necesitaría aproximadamente de 500 años de evolución independiente. Sin embargo hay que considerar que las suposiciones realizadas probablemente subestiman la rapidez que estos procesos tienen en la naturaleza (es probable que en una progenie de 1000 fagos ocurran varios eventos de replicación exitosos antes de 20 días) y el tiempo necesario para que se perpetúen estas diferencias podría ser menor.

El descubrimiento de fagos prácticamente idénticos provenientes de zonas geográficas distantes ha sido reportado previamente. Los fagos  $\Phi$ KMV y LKD16, que comparten un 80% de identidad en sus genomas, fueron aislados de muestras de agua provenientes de Rusia y Bélgica, respectivamente (Ceysens y col., 2006).

## **2. Persistencia de VP93 junto a la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*.**

En este trabajo se realizó una búsqueda de fagos de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en un esfuerzo por explorar un posible rol en la supervivencia de la cepa pandémica en el ambiente. Los resultados muestran que el fago produce placas de lisis turbias y no afecta notoriamente el crecimiento de la bacteria, incluso utilizando altas multiplicidades de infección (Fig. 5). Se observó un alto porcentaje de bacterias naturalmente resistentes bajo estas mismas condiciones. Estas observaciones sugieren que este grupo de fagos no tendría mayor influencia en la propagación de la cepa pandémica en el ambiente.

Una de las características más interesantes del fago VP93 es que a pesar de no afectar en forma evidente el crecimiento de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, es capaz de replicarse e incluso persistir junto a la

bacteria. Los resultados presentados en este trabajo muestran que el fago puede persistir junto a la bacteria incluso después de 5 sub-cultivos seriados a una proporción aproximada de un fago por bacteria (Fig. 6). La persistencia del fago no se debe a la persistencia de bacterias lisogénicas ya que no se encontró rastros de genes del fago en las bacterias resistentes en estos cultivos. Además VP93 pertenece un grupo de fagos líticos sin genes asociados a fagos temperados. La persistencia de los fagos y bacterias tampoco se debe a que el fago sea capaz de salir de la bacteria sin necesidad de romperla, como en el fago M13 (Russel y Model, 2006); en este caso los genes del fago deberían haber sido detectados en las bacterias resistentes analizadas.

La persistencia de fagos líticos en cultivos bacterianos líquidos ha sido descrita previamente. Este fenómeno ha sido conocido como "carrier state" o pseudolisogenia (Barksdale y Arden, 1974). Este fenómeno puede ser explicado por la presencia de dos sub-poblaciones en el cultivo bacteriano, una sensible a la infección del fago y otra resistente, ambas a similares concentraciones incluso en cultivos iniciados a partir de una colonia única. El fago PPO1, es capaz de coexistir establemente con *Escherichia coli* O157:H7, sin establecer una lisogenia, tal como ocurre con VP93. Esta situación ha sido explicada por una heterogeneidad de la población bacteriana conteniendo bacterias sensibles y resistentes (Fischer y col., 2004). Algo similar ocurre con fagos de *Salmonella spp* (Carey-Smith y col., 2006) y *Flavobacterium psychrophilum* (Middelboe y col., 2009). En ambos

casos se sugiere que esta situación puede deberse a que una subpoblación del cultivo es sensible al fago, sin embargo, en ninguno de estos trabajos se explica como se mantiene esta subpoblación sensible.

Dos sub-poblaciones, una resistente y otra sensible al fago, ambas a concentraciones similares, podrían explicar los resultados obtenidos en la infección de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con VP93, si es que ambas sub-poblaciones son intercambiables entre sí a una frecuencia similar para ambas direcciones. Este intercambio a alta frecuencia podría explicarse por un mecanismo de cambio de fase, donde las bacterias sensibles producen fago y mueren, mientras que las bacterias resistentes continúan creciendo. Estas bacterias generarían nuevas bacterias sensibles que permitirían que el fago se replique y persista en el cultivo (Fig. 6). La resistencia a fagos asociada a un mecanismo de cambio de fase ha sido reportada previamente en *Streptomyces coelicolor* (Sumbly y Smith, 2003) y *Haemophilus influenzae* (Zaleski y col., 2005).

Como muchas otras especies bacterianas, *V. parahaemolyticus* presenta un cambio de fase reversible manifestado por el cambio entre una morfología de colonias opacas (op) y translúcidas (tr) (McCarter y col., 1999). El fenotipo opaco es resultado de una alta producción de polisacárido capsular (Enos-Berlage y McCarter, 2000). Para determinar si la alternancia entre diferentes morfotipos celulares de *V. parahaemolyticus* esta relacionada con la resistencia a VP93 se estudio el efecto del fago en cultivos líquidos

provenientes tanto de una colonia opaca como translúcida de la cepa pandémica. Los resultados muestran que VP93, al igual que ocurre con los cultivos originales, no tiene un efecto evidente en el crecimiento de bacterias opacas o translúcidas. Del mismo modo se logró determinar que el fago también es capaz de persistir en sub-cultivos de bacterias de ambas fases (Fig. 7). Estos resultados sugieren que la resistencia a VP93 no está asociada al cambio de fase entre colonias opacas y translúcidas observado en *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar que la resistencia al fago esté relacionada con un mecanismo de cambio de fase distinto al que se ha presentado.

El fracaso en la búsqueda de clones resistentes y sensibles a partir de colonias puede ser explicado por una alta variación entre resistentes y sensibles: Si la tasa de intercambio de bacterias sensibles a resistentes y viceversa fuese similar a 0,01 por generación, las colonias, aunque deriven de una sola célula, resistente o sensible, tendrían ambos tipos de bacterias. Esta situación fue modelada utilizando el programa Berkeley Madonna (Levin y Bull, 2004) y los resultados arrojados por el modelo se ajustan a los obtenidos experimentalmente (Fig. 5 y 6), donde se observa que el fago puede persistir junto a la bacteria incluso a través de sub-cultivos seriados de diluciones 1/100. Estos datos sugieren fuertemente que la explicación propuesta de dos sub-poblaciones bacterianas, una resistente al fago y otra sensible, ambas intercambiables entre sí a una alta frecuencia, sería cierta.

*V. parahaemolyticus* es una bacteria que plantea una serie de dificultades para manipularla genéticamente, un ejemplo es su resistencia natural a varios antibióticos, lo que limita en gran medida el uso de estos marcadores (Okoh y Igbiosa, 2010; Baker-austin y col., 2008). A pesar de esto, se intentó generar un banco de mutantes de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con la intención de detectar los posibles elementos genéticos participantes en la resistencia a VP93, lamentablemente todos los intentos realizados fueron infructíferos. Debido a esto se optó por una estrategia alternativa y se generó una mutante en el gen *hsdR* del sistema de restricción modificación tipo I, pues este gen podría estar involucrado en la resistencia a VP93. Los sistemas de restricción bacteriano participan activamente en la defensa contra fagos e incluso se ha visto que pueden estar regulados por un mecanismo de cambio de fase (Zaleski y col., 2005). Además existen evidencias que sugieren que este sistema de restricción en *V. parahaemolyticus*, estaría específicamente asociado a la cepa pandémica de la bacteria (Wang y col., 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos al infectar la mutante generada con VP93, sugieren que este sistema de restricción modificación no participaría en el mecanismo de defensa contra el fago (Fig. 9).

El "carrier state", o la replicación del fago sin dañar a su hospedero, en coexistencia como se describe acá, puede ser ventajoso para la persistencia tanto de la bacteria como el fago. Un fago que mate completamente a sus bacterias hospederas eventualmente podría tener dificultades para encontrar



una célula donde replicarse, mientras que para la bacteria resulta mucho más conveniente convivir con un fago que le permita crecer sin mayores problemas. Esta particular situación podría permitir que VP93 sea más exitoso para persistir en el ambiente en comparación con otros fagos que matan completamente a sus hospederos. Esto podría explicar porqué este grupo de fagos está tan ampliamente distribuido y fue el único tipo de fagos encontrado en el estudio, en desmedro de otros fagos como KVP40.

Es importante considerar que debido a que los fagos son aislados o detectados por la formación de placas de lisis, los fagos que pueden replicarse sin afectar evidentemente el crecimiento de su <sup>h</sup>hospedero podrían existir en la naturaleza en mayor cantidad a lo reportado hasta el momento. Esto debido a la dificultad para detectar las placas de lisis en estos casos. Este tipo de relación entre fago y bacteria genera un fenómeno similar a lo que ocurre con las bacterias "no cultivables". Los fagos como VP93 son difícilmente detectados a menos que se cuente con otro hospedero que sea lisado con mayor eficiencia. Es posible que el gran número de potenciales fagos no cultivados observados en estudios de metagenómica correspondan a fagos con este tipo de características (Breitbart y Rohwer, 2005).

### **3. Efecto de fago VP93 en la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* con otras cepas no pandémicas. Comparación con efecto de fago VP58.5.**

Los fagos juegan un papel crucial en la regulación de la estructura y composición de las comunidades bacterianas en ambientes acuáticos (Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004). La teoría sugiere que los fagos imponen una regulación dependiente de la densidad de las poblaciones bacterianas, previniendo que las especies dominantes más competitivas desplacen completamente a las menos competitivas. Pero, también pueden afectar la competitividad de una bacteria de una forma diferente como con la conversión lisogénica (Paul, 2008). En cualquier caso la especificidad del fago es fundamental al momento de determinar su influencia en una comunidad determinada. Existen trabajos que estudiaron el efecto de los fagos en la competencia entre distintas especies bacterianas (Brockhurst y col., 2006), e incluso entre distintas cepas de una misma especie (Bossi y col., 2003; Erickson y col., 2009). Sin embargo, estos trabajos fueron realizados principalmente con cepas bacterianas de laboratorio y se desconoce el efecto que los fagos puedan tener en la competitividad de bacterias ambientales, o como pueden afectar la competencia entre una cepa bacteriana patógena y una no patógena.

En el laboratorio se cuenta con una amplia colección de cepas ambientales de *V. parahaemolyticus* pandémicas y no pandémicas. Además del fago

VP93, también se ha logrado aislar y caracterizar el fago VP58.5 que también infecta la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* (Zabala y col., 2009). Entonces resulta interesante comparar que efecto tienen estos fagos en la competencia entre la cepa pandémica y otras cepas de *V. parahaemolyticus*.

VP58.5 es un fago temperado telomérico que se mantiene dentro de la bacteria en la forma de un plasmidio lineal. Los estudios realizados en el laboratorio demostraron que las bacterias lisogenizadas con este fago presentan mayor sensibilidad a la luz UV y a la radiación solar (Zabala y col., 2009). Además se determinó que este fago es capaz de infectar cerca del 30% de las cepas pandémicas aisladas tanto de pacientes como de choritos en el sur de Chile (Zabala, 2010), pero por otro lado no infecta ninguna de las cepas no pandémicas que cohabitan con la pandémica en los choritos (Tabla 4). Por el momento se desconoce si las bacterias lisogenizadas por VP58.5 adquieren algún tipo de inmunidad a la infección con otros fagos. Estos resultados permiten concluir que VP58.5 afectaría solamente a la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, y que su efecto sería negativo en su competencia reproductiva (fitness), ya que las bacterias de ser infectadas por este fago serían lisadas o lisogenizadas, y al ser lisogenizadas adquirirían una mayor sensibilidad a la radiación solar que puede resultar perjudicial para la bacteria debido a que en su ambiente natural (océano) puede pasar una gran cantidad de horas expuesta al sol.

En este trabajo se ha caracterizado la infección del fago VP93 a la cepa pandémica PMC57.5 de *V. parahaemolyticus*. Los resultados han mostrado que el fago es capaz de convivir con la cepa pandémica y que además puede infectar cerca del 50% de cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus* probadas (Tabla 4), incluso algunas con mayor eficiencia que a la cepa pandémica (Fig. 11). Esto puede deberse a que las bacterias que presentan mayor sensibilidad al fago contengan un menor porcentaje de bacterias naturalmente resistentes dentro de su población. Al examinar posibles situaciones de competencia entre cepas de distintos grupos de *V. parahaemolyticus* se pudo determinar que en un co-cultivo entre la cepa pandémica PMC57.5 y una cepa no pandémica PMA112, que presenta una mayor sensibilidad al fago, la presencia de VP93 favorece la prevalencia de la cepa pandémica. En ausencia del fago la cepa PMA112 está presente en una mayor proporción en el cultivo, en cambio, cuando el fago está presente, esta cepa es indetectable (Fig. 12). Por otro lado, cuando se co-cultiva la cepa pandémica con una cepa no pandémica que es resistente al fago, el crecimiento de ambas cepas no se ve mayormente afectado por la presencia del fago (Fig. 13).

A partir de estas observaciones se podría concluir que, a diferencia de lo que ocurre con VP58.5, VP93 a pesar de ser un fago lítico, tendría un efecto positivo sobre la competitividad de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, ya que, es capaz de convivir con la bacteria sin afectar en forma evidente su crecimiento, pero al mismo tiempo puede afectar el

crecimiento de otras bacterias no pandémicas que podrían competir con la pandémica. Esto representaría una ventaja para la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* porque VP93 podría matar otras cepas no pandémicas que estén compitiendo en el mismo hábitat.

VP93 podría actuar como un "arma biológica" o una bacteriocina (Riley y Gordon, 1999) que posee la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, en una interacción que parece ser ventajosa tanto para la bacteria como para el fago. Esta situación podría en parte explicar porque VP93 parece estar ampliamente distribuido en distintas zonas geográficas y al mismo tiempo porque esta cepa bacteriana ha prevalecido en todo el mundo a través de casi 15 años causando anualmente miles de casos de diarrea asociados al consumo de mariscos contaminados (Bag y col., 1999; Bhuiyan y col., 2002; Martínez-Urtaza y col., 2004). Resultaría interesante determinar cuales son los componentes genéticos en la bacteria que permiten que exista esta particular relación entre el fago y la bacteria. Del mismo modo también sería interesante investigar si el fago está presente en otras zonas donde ocurren continuamente intoxicaciones causadas por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, como el sudeste asiático o África. De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, no resultaría extraño encontrar en esos lugares fagos estrechamente relacionados con los acá descritos.

## CONCLUSIONES

- 1.- Los fagos de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* conforman un grupo de podofagos estrechamente relacionados a pesar de su distante origen geográfico.
- 2.- Los Fagos de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* pertenecen a un sub-grupo de fagos tipo T7 llamado  $\Phi$ KMV, que esta formado por los fagos de *Pseudomonas aeruginosa* LKA1, LKD16, LUZ19 y  $\Phi$ KMV y se caracterizan por la posición del gen de la RNA polimerasa.
- 3.- El Fago VP93 no afecta el crecimiento de *V. parahaemolyticus* pandémico pero es capaz replicarse y persistir junto con la bacteria. La persistencia del fago junto a la bacteria se explicaría por la presencia en los cultivos de dos sub-poblaciones una sensible y otra resistente que se intercambian entre si a alta frecuencia.
- 4.- La infección de la mutante en el gen *hsdR* del sistema de restricción-modificación tipo I de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* sugiere que éste sistema no participaría en el mecanismo de resistencia al fago VP93.

- 5.- El fago VP93 tiene actividad lítica en distintas cepas no pandémicas de *V. parahaemolyticus*, algunas con mayor efectividad que la cepa pandémica.
  
- 6.- El fago VP93 al convivir con la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* e infectar otras cepas no pandémicas podría actuar como un "arma biológica" otorgando una ventaja competitiva a la cepa pandémica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedon S. (2006). Phage ecology. En Calendar R. The bacteriophages. pp 146-160. Oxford Universiti Press, New York.
- Angly F.E., Felts B., Breitbart M., Salamon P., Edwards R.A., Carlson C., Chan A.M., Haynes M., Kelley S., Liu H., Mahaffy J.M., Mueller J.E., Nulton J., Olson R., Parsons R., Rayhawk S., Suttle C.A. y Rohwer F. (2006). The marine viromes of four oceanic regions. *PLOS Biol.* **4**:2121-2131.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Barksdale L. y Arden S.B. (1974) Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. *Annu. Rev. Microbiol.* **28**:265-299.
- Baros J., Liston J., y Morita R. (1978). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:492-499.
- Bag P., Nandi S., Bhadra R., Ramamurthy T., Bhattacharya S., Nishibuchi M., Hamabata T., Yamasaki S., Takeda Y. y Nair G. (1999). Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2354-2357.
- Baker-Austin C., McArthur J.V., Tuckfield R.C., Najarro M., Lindell A.H., Gooch J. y Stepanauskas R. (2008). Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA. *J. Food. Prot.* **71**:2552-2558.
- Bergh O., Borsheim K., Bratbak G. y Haldal M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**:467-468.
- Berney M., Weilenmann H.U., Ihssen J., Bassin C. y Egli T. (2006) Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2586-2593.
- Bhuiyan N., Ansaruzzaman M., Kamruzzaman M., Alam K., Chowdhury N.R., Nishibuchi M., Faruque S., Sack D., Takeda Y. y Nair G. (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.
- Bossi L., Fuentes J., Mora G. y Figueroa-Bossi N. (2003). Prophage Contribution to Bacterial Population Dynamics. *J. Bacteriol.* **185**:6467-6471.



Breitbart M. y Rohwer F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. *Trends Microbiol.* **13**:278-284.

Breitbart M., Salamon P., Andresen B., Mahaffy J.M., Segall A.M., Mead D., Azam F. y Rohwer F. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:14250-14255.

Brockhurst M.A., Fenton A., Roulston B. y Rainey P. (2006). The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecology* **6**:19.

Brüssow H., Canchaya C. y Hardt W. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:560-602.

Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.L. y Brüssow H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:417-424.

Canchaya C., Fournous G. y Brüssow H. (2004). The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* **53**:9-18.

Carey-Smith G.V., Billington C., Cornelius A.J., Hudson J.A. y Heineman J.A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:182-186.

Ceyssens P.J., Lavigne R., Mattheus W., Chibeu A., Hertveldt K., Mast J., Robben J. y Volckaert G. (2006). Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: establishment of the phiKMV subgroup within the T7 supergroup. *J. Bacteriol.* **188**:6924-6931.

Chowdhury N.R., Chakraborty S., Eampokalap B., Chaicumpa W., Chongsanguan M., Moolasart P., Mitra R., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Nishibuchi M., Takeda Y. y Nair G.B. (2000). Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3:K6 and O4:K68) in Thailand and India. *Epidemiol. Infect.* **125**:17-25.

Chowdhury N., Stine C., Morris G. y Nair B. (2004). Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1280-1282.

Clark J.R. y March J.B. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol.* **24**:212-218.

Comeau A., Buenaventura E. y Suttle C. (2005). A persistent, productive, and seasonally dynamic Vibriophage population within pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5324-5331.

Comeau A. y Chan A.M. (2006). Genetic richness of vibriophages isolated in a coastal environment. *Environ. Microbiol.* **8**:1164-1176.

Cordova J., Astorga J., Silva W. y Riquelme C. (2002). Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997–1998 Chilean outbreak. *Biol. Res.* **35**:433–440.

De Lorenzo V. y Timmis K. (1994). Analysis and Construction of Stable Phenotypes in Gram-Negative Bacteria with Tn5- and Tn10-Derived Minitransposons. *Meth. Enzymol.* **235**:386-405.

DePaola A., Nordstrom I., Bowers J., Wells J. y Cook D. (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1521-1526.

DePaola A., Kaysner C., Bowers J. y Cook D. (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.

Drake J.W. (1999). The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **870**:100-107

Enos-Berlage J. y McCarter L.L. (2000). Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **182**:5513–5520.

Erickson M., Newman D., Allen Helm R., Dino A., Calcutt M., French W. y Eisenstark A. (2009). Competition among isolates of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium: role of prophage/phage in archived cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **294**:37-44.

Faruque S.M., Naser I.B., Islam M.J., Faruque A.S.G., Ghosh A.N., Nair G.B., Sack D.A. y Mekalanos J.J. (2004). Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **102**:1702-1707.

Fischer C.R., Yoichi M., Unno H. y Tanji Y. (2004) The coexistence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and its specific bacteriophage in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**:171-177.

Frost L., Leplae R., Summers A. y Toussaint A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:722-732.

- Fuenzalida L., Hernández C., Toro J., Rioseco M., Romero J. y Espejo R. (2006). *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ. Microbiol.* **8**:675-683.
- Fuhrman J.A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**:541-548.
- García K., Torres R., Uribe P., Hernández C., Rioseco M.L., Romero J. y Espejo R. T. (2009). Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* Straits Turing seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:7482-7487.
- González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., Romero J., Espejo R.T., Jaykus L.A., y DePaola A. (2008). Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.* **190**:2831-2840.
- Gonzalez-Escalona N., Cachicas V., Acevedo C., Rioseco M. L., Vergara J. A., Cabello F., Romero J. y Espejo R. T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:129-131.
- Hara-Kudo Y., Sugiyama K., Nishibuchi M., Chowdhury A., Yatsuyanagi J., Ohtomo Y., Saito A., Nagano H., Nishina T., Nakagawa H., Konuma H., Miyahara M. y Kumagai S. (2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3883-3891.
- Hardies S.C., Comeau A.M., Serwer P. y Suttle C.A. (2003). The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting *Vibrio parahaemolyticus* indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment. *Virology* **310**:359-371.
- Harth E., Matsuda L., Hernandez C., Rioseco M. L., Romero J., Gonzalez-Escalona N., Martínez-Urtaza J. y Espejo R. T. (2009). Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:163-168.
- Hobbie J.E., Daley R.J. y Jasper S. (1977). Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:1225-1228.
- Ichige A., Matsutani S., Oishi K. y Mizushima S. (1989). Establishment of gene transfer systems for and construction of the genetic map of a marine *Vibrio* strain. *J. Bacteriol.* **171**:1825-1834.
- Iida T., Hattori A., Tagomori K., Nasu H., Naim R. y Honda T. (2001). Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:477-478.

Jiang S. y Paul J. (1994). Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**:163-172.

Koga T., y Kawata T. (1991). Comparative characterization of inducible and virulent *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages having unique head projections. *Microbiol. Immunol.* **35**:49-58.

Labrie S.J., Samson J.E. y Moineau S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:317-327.

Lan S., Huang C., Chang C., Liao W., Lin I., Jian W., Wu Y., Chen S. y Wong H. (2009). Characterization of a new plasmid-like prophage in a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:2659-2667.

Levin B.R. y Bull J.J. (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:166-173.

McCarter L.L. (1998). OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **180**:3166-3173

McCarter L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:51-57

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. y Iida T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. *The Lancet* **361**:743-749.

Martinez-Urtaza J., Huapaya B., Gavilan R.G., Blanco-Abad V., Ansedo-Bermejo J., Cadarso-Suarez C., Figueiras A. y Trinanes J. (2008). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. *Epidemiology* **19**:829-837.

Martinez-Urtaza J., Lozano-Leon A., DePaola A., Ishibashi M., Shimada K., Nishibuchi M. y Liebana E. (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4672-4678.

Matsumoto C., Okuda J., Ishibashi M., Iwanaga M., Garg P., Rammamurthy T., Wong H., DePaola A., Kim Y., Albert M. y 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.

Matsuzaki S., Tanaka S., Koga T. y Kawata T. (1992). A broad-host-range vibriophage, KVP40, isolated from sea water. *Microbiol. Immunol.* **36**:93-97.

Middelboe M., Holmfeldt K., Riemann L., Nybroe O. y Haaber J. (2009). Bacteriophages drive strain diversification in a marine *Flavobacterium*: Implications for phage resistance and physiological properties. *Environ. Microbiol.* **11**:1971-1982.

Miller E.S., Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Durkin A.S., Ciecko A., Feldblyum T., White O., Paulsen I.T., Nierman W.C., Lee J., Szczypinski B. y Fraser C.M. (2003). Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage KVP40: comparative genomics of a T4-related bacteriophage. *J. Bacteriol.* **185**:5220-5233.

Mudgal P., Breidt Jr. F., Lubkin S.R. y Sandeep K.P. (2006). Quantifying the Significance of Phage Attack on Starter Cultures: a Mechanistic Model for Population Dynamics of Phage and Their Hosts Isolated from Fermenting Sauerkraut. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:3908-3915.

Muramatsu K. y Matsumoto H. (1991). Two generalized transducing phages in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. *Microbiol. Immunol.* **35**:1073-1084.

Nair B., Ramamurthy T., Bhattacharya S., Dutta B., Takeda Y. y Sack D. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:39-48.

Nasu H., Iida T., Sugahara T., Yamaichi Y., Park K., Yokoyama K., Makino K., Shinagawa H. y Honda T. (2000). A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2156-2161.

Oakey J. y Owens L. (2000). A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.* **89**:702-709.

Okoh A. y Igbinosa E. (2010). Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *BMC Microbiol.* **10**:143.

Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A., Garg S., Bhattacharya S., Nair G. y Nishibuchi M. (1997). 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.

Olea A. M., Gonzalez C., Chiu M., Vallebuona C., Labraña M. y Martiniello F. (2005). Brote de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Chile. *Revista Chilena Salud Pública*. **9**:51-53.

Ohnishi T. y Nozu K. (1986). Induction of phage-like particles from a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* by mitomycin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**:1249-1253.

Philippe N., Alcaraz J., Coursange E., Geiselmann J. y Schneider D. (2004). Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid* **51**:246-255.

Paul J. H. (2008). Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J.* **2**:579-589.

Riley M.A. y Gordon D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**:129-133

Rohwer F. y Edwards R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J. Bacteriol.* **184**:4529-4535.

Rohwer F. y Vega R. (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature* **459**:207-212.

Russel M. y Model P. (2006). Filamentous phage. En Calendar R. The bacteriophages. pp 146-160. Oxford University Press, New York.

Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A. y Barrell B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**:944-945.

Seguritan V., Feng I., Rohwer F., Swift M. y Segall A.M. (2003). Genome sequence of two closely related *Vibrio parahaemolyticus* phages, VP16T and VP16C. *J. Bacteriol.* **185**:6434-6447.

Stopar D., Cerne A., Zigman M., Poljsak-Prijatelj M. y Turk V. (2004). Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microb. Ecol.* **47**:1-8.

Strom S. (2008). Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective. *Science* **320**:1043-1045.

Sumbly P. y Smith M.C. (2003). Phase variation in the phage growth limitation system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **185**:4558-4563.

Waldor M. y Mekalanos J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding toxin. *Science* **272**:1910-1914.

- Wang H., Wong M., O'Toole D., Mak M., Wu R. y Kong R. (2006). Identification of a DNA Methyltransferase Gene Carried on a Pathogenicity Island-Like Element (VPAI) in *Vibrio parahaemolyticus* and Its Prevalence among Clinical and Environmental Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4455-4460.
- Weinbauer M. y Suttle C. (1996). Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4374-4380.
- Weinbauer M. y Rassoulzadegan F. (2004). Are viruses driving microbial diversification and diversity?. *Environ. Microbiol.* **6**:1-11.
- Wiggins B. y Alexander M. (1985). Minimum Density for Bacteriophage Replication: Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:19-23.
- Wilhelm S. y Suttle C. (1999). Viruses and nutrient cycles in the sea-viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *Bioscience* **49**:781-88.
- Williamson S.J., Mclaughlin M.R. y Paul J.H. (2001). Interaction of the  $\phi$ HSIC virus with its host: lysogeny of pseudolysogeny?. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1682-1688.
- Wommack K.E. y Colwell R.R. (2000). Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:69-114.
- Zabala B., Garcia K. y Espejo R. (2009). Enhancement of UV light sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strain due to natural lysogenization by a telomeric phage. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1697-1702.
- Zabala B. (2010). CARACTERIZACIÓN DEL FAGO TEMPERADO TELOMÉRICO VP58.5 ENCONTRADO EN LA CEPA PANDÉMICA DE *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis Doctoral Universidad de Chile.
- Zaleski P., Wojciechowski M. y Piekarowicz A. (2005). The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection. *Microbiology* **151**:3361-3369.