

UCH-FC  
DOC - Microbiología  
Z12  
C.1

**CARACTERIZACIÓN DEL FAGO TEMPERADO TELOMÉRICO  
VP58.5 ENCONTRADO EN LA CEPA PANDÉMICA DE  
*Vibrio parahaemolyticus*.**

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

**Beatriz Eugenia Zabala Torres**

Director de Tesis:

**Dr. Romilio Espejo T.**

Enero del 2010.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

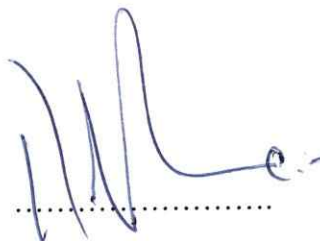
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

**BEATRIZ EUGENIA ZABALA TORRES**

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 26 de noviembre de 2009.

**Director de Tesis:**

Dr. Romilio Espejo T

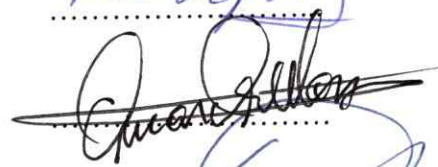


**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dra. Rosalba Lagos



Dr. Omar Orellana



Dr. Nicolas Guiliani



**Con todo mi amor para:**

*Mi esposo e hija: JORGE y CAMILA*

*Mis padres: HERCILIA y MIGUEL*

*Mis hermanos: ELAINE y JUAN MIGUEL*



A TODA LA FAMILIA Y AMIGOS QUE DESDE LO LEJOS ME APOYARON



Soy colombiana, nací en Medellín, Antioquia el 23 de junio de 1979. Viví junto a mis padres y hermanos en Caucasia, un pequeño municipio ubicado en el noroccidente de Antioquia. Allí vivimos hasta 1993. En ese año nos mudamos hacia Medellín, con el fin de terminar la educación media e ingresar a la universidad. Me interesé por una carrera del área de la salud que tuviera proyección y oportunidad para investigar, fue así que me incliné por estudiar Bacteriología y Laboratorio Clínico en el Colegio Mayor de Antioquia. En el 2001 me gradué y trabajé en el área clínica y luego en docencia universitaria, en la misma universidad donde estudié. Allí conocí a mi esposo Jorge, con quien emprendí esta aventura juntos. Buscando mejores opciones laborales viajamos a Iquique por el trabajo de mi esposo y yo postulé al doctorado en Microbiología de la Universidad de Chile y a la beca del DAAD. En Iquique me enteré que había quedado en el doctorado, así que nos mudamos hacia Santiago y mi esposo cambió su trabajo. En el 2005 inicié mi doctorado, lo cual ha sido una gran experiencia académica y personal, la cual han sido 5 años de mi vida. En el Laboratorio de Biotecnología del INTA, realicé la tesis la junto a un gran tutor, Romilio Espejo, quien me guió en todo este proceso. En el 2008 viajé a Berlín, Alemania a realizar una pasantía en el Bundesinstitut für Risikobewertung con el Dr. Stefan Hertwig. El 21 de julio del 2009, llega a nuestras vidas un gran regalo, nuestra hija Camila María. Es así que junto a mi Familia inicio otra etapa en el camino, la de investigadora y madre, no sin antes agradecerles por todo su amor y paciencia para realizar este doctorado.



## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi fortaleza y acompañarme siempre en todo momento.

A mi esposo Jorge, por su amor, su compañía, su incondicional y constante apoyo, que ha sido mi refugio y fortaleza en los momentos felices y duros del camino.

A mi Camila, por ser la nueva luz en mi vida.

A mis padres Hercilia y Miguel, por todo su amor, su apoyo, sus consejos, su constante apoyo, y a pesar de la distancia física siempre han estado ahí, mil gracias por todo.

A mis hermanos Elaine y Juan Miguel, por su ánimo, sus palabras de aliento y estar siempre pendiente de mí.

A mi abuela Carmen Espinosa, por sus oraciones, sus buenos deseos, y sus bellos detalles que siempre me acompañaron.

A mis suegros Jorge y Victoria, por acompañarme desde lo lejos en esta dura batalla y por sus oraciones.

Al profesor Romilio Espejo por permitirme trabajar en su laboratorio, por confiar en mí, por sus consejos, sus enseñanzas y por ser un gran maestro del cual aprendí muchísimo.

A los profesores de la comisión de evaluación de esta Tesis Dra. Rosalba Lagos, Dr. Omar Orellana y Dr. Nicolas Guilianni, por sus críticas, correcciones y aportes al desarrollo de esta tesis.

A mis amigos del laboratorio de Biotecnología del INTA, Erika Harth, Loreto Fuenzalida, Lorena Armijo, Roberto Bastías, Katherine García, Daniel Castillo, Mónica Villa, Gastón Higuera, Rafael Torres por su amistad, su compañía, por sus aportes a mi trabajo, por las discusiones, las sugerencias, los tecitos, almuerzos, cenas y carretes que compartimos juntos.

A Andrés Villa y Diego Gaitán por su amistad, su compañía y por los momentos que compartimos juntos.

A la "confederación latinoamericana de amigos", Pilar Martínez, Mario Paez, Lina Ruiz, Julieta Orlando, Hugo Begazo, Cecilia Pabón, Sergio Gutiérrez, por todos los gratos momentos que compartimos juntos.

A Stefan Hertwig por toda la colaboración prestada durante los cinco meses que trabajé en su laboratorio en el Bundesinstitut für Risikobewertung en Berlín. Y a toda la gente de su laboratorio por su colaboración. A Jochen Reetz por el microscopio electrónico.

Al DAAD - Deutscher Akademischer Austausch Dienst por financiar mis estudios de doctorado en Chile y la pasantía en Alemania. Al proyecto Fondecyt 1070658 por la financiación para el desarrollo de la Tesis.

## INDICE DE MATERIAS



	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xvi
INTRODUCCION	
1. Ecología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	1
2. <i>V. parahaemolyticus</i> en Chile.	3
3. Fagos en las bacterias marinas y su importancia en la Evolución bacteriana.	4
4. Fagos Teloméricos.	7
4.1. Estructura de los DNAs del plasmidio y fago N15.	8
4.2. Conversión y generación del plasmidio lineal.	9
4.3. Características de la protelomerasa.	9
4.4. Organización genómica de los fagos teloméricos.	12
MATERIALES Y METODOS	
1. Aislamiento y caracterización de <i>V. parahaemolyticus</i> de muestras clínicas y ambientales.	14
2. Cepas y condiciones de cultivo.	15



3. Análisis de DNA.	16
4. Aislamiento y purificación del fago VP58.5.	17
5. Extracción y caracterización del DNA del fago VP58.5.	18
6. Clonación, amplificación por PCR y secuenciación de los clones.	19
7. Inducción con lámpara de luz ultravioleta.	21
8. Inducción con irradiación solar.	22
9. Curación de plasmidios.	23
10. Microscopía electrónica.	23
11. Mapa de restricción.	24
12. Determinación de los extremos cohesivos del fago.	24
13. Determinación de los extremos covalentemente unidos del profago.	25
14. Secuenciamiento del genoma de VP58.5 y análisis de secuencia.	25
15. Geles SDS-PAGE y análisis de las proteínas por espectrometría de masas.	26
16. Números de acceso a las secuencias nucleotídicas.	27
17. Ensayos de infección con el fago VP58.5.	28
18. Estudio de la lisogenización por el fago VP58.5.	29
19. Rango de hospedero.	29
20. Inducción en hambruna.	29

## RESULTADOS

1. Caracterización de las cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	31
1.1. Detección de variantes en cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	31
2. Caracterización inicial de las variantes con el DNA extracromosomal de	35



42 Kb.	
2.1. Diversidad del DNA extracromosomal.	35
2.2. Determinación de la naturaleza del DNA extracromosomal de 42 Kb.	37
2.3. Existencia de genes estructurales y de replicación específicos del fago VHML de <i>V. harveyi</i> .	38
2.4. Inducción con mitomicina C.	39
3. Caracterización detallada del fago VP58.5.	42
3.1. Determinación de la permutación circular entre los DNAs del fago y profago VP58.5.	42
3.2. Caracterización de los extremos del DNA del profago.	43
3.3. Determinación de los extremos del DNA del fago.	45
3.4. Determinación de la secuencia nucleotídica del fago VP58.5.	48
3.5. Composición de proteínas del fago VP58.5.	52
4. Efecto de la presencia del fago VP58.5 en el crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> .	55
4.1. Inducción de VP58.5 con luz UV.	55
4.2. Determinación del aumento de la sensibilidad a la luz UV por la presencia del profago.	56
4.3. Determinación del rango de hospedero del fago VP58.5.	60
4.5. Estudio de la lisogenia por el fago VP58.5.	62
DISCUSION	
1. Caracterización de las cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .	63
2. Caracterización de las variantes con el DNA extracromosomal de 42 Kb	64
3. Caracterización del fago VP58.5.	66



3.1. Extremos covalentemente unidos en el profago VP58.5.	67
3.2. Extremos cohesivos del fago VP58.5.	69
3.3. Secuenciación del fago VP58.5.	70
3.4. Composición de proteínas del fago VP58.5.	73
4. Efecto de la presencia del fago VP58.5 en el crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i> .	73
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	90



## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Origen de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> usadas en el estudio y el método usado para el análisis.....	17
<b>Tabla 2.</b> Lista de partidores para las amplificaciones por PCR de ORFs identificados en el fago VHML y clones del plasmidio de 42 Kb.....	20
<b>Tabla 3.</b> Variantes en cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	32
<b>Tabla 4.</b> Presencia del plasmidio de 42 Kb en cepas pandémicas de <i>V. parahaemolyticus</i> obtenidas de muestras clínicas y de mariscos...	36
<b>Tabla 5.</b> Comparación de las secuencias nucleotídicas de ORFs en clones seleccionados con la secuencia de ORFs de VHML.....	38
<b>Tabla 6.</b> Identities de secuencia nucleotídica del plasmidio de 42 Kb con el fago temperado VHML de <i>V. harveyi</i> .....	39
<b>Tabla 7.</b> Sensibilidad de distintas cepa y especies de <i>Vibrio</i> al fago VP58.5.....	61

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de conversión del DNA del fago N15 al profago tipo plasmidio lineal.....	11
<b>Figura 2.</b> Presencia del fragmento adicional de 42 Kb en aislados variantes de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	33
<b>Figura 3.</b> Detección del DNA extracromosomal en cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémicas.....	34
<b>Figura 4.</b> Patrones de restricción del DNA de 42 Kb.....	37
<b>Figura 5.</b> Inducción con mitomicina C de cepas con y sin el plasmidio de 42 Kb.....	40
<b>Figura 6.</b> Partículas virales observadas por tinción negativa después de la inducción con mitomicina C de la cepa tipo PMC58.5 de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	40
<b>Figura 7.</b> DNA extraído desde la partícula viral y del plasmidio de diferentes variantes.....	41
<b>Figura 8.</b> Permutación circular entre el fago y profago de VP58.5.....	44

<b>Figura 9.</b> Determinación de los extremos covalentemente unidos del DNA del profago VP58.5.....	45
<b>Figura 10.</b> Determinación de los extremos cohesivos del DNA del fago.....	47
<b>Figura 11.</b> Organización genómica de los fagos VP58.5 y VHML.....	50
<b>Figura 12.</b> Diagrama de la región <i>telRL</i> del fago VP58.5.....	52
<b>Figura 13.</b> Composición proteínas de VP58.5.....	54
<b>Figura 14.</b> Inducción con luz UV del profago VP58.5.....	56
<b>Figura 15.</b> Efecto de la radiación con lámpara de luz UV y solar en la sobrevida de las cepas PMC58.5 y PMA37.5.....	57
<b>Figura 16.</b> Curva de sobrevida después de irradiación UV en cepas curadas y no curadas.....	59
<b>Figura 17.</b> Placas de lisis producidas por el fago VP58.5 sobre la cepa PMC58.5-UVC (curada con luz UV).....	60

## 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
ATC	: Aislado clínico de Antofagasta
COC	: Aislado clínico de Copiapó
NOA	: Aislado clínico de Antofagasta
bp	: Pares de bases
Kb	: Kilo bases
kDa	: Kilo daltons
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	: Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato
ORF	: Marcos de lectura abiertos
<i>cos</i>	: Extremos del DNA cohesivos
VHML	: Fago tipo Myovirus aislado en <i>Vibrio harveyi</i>
PY54	: Fago temperado aislado en <i>Yersinia enterocolitica</i>

- N15 : Fago temperado aislado en *Escherichia coli*
- VP882 : Fago temperado aislado de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6
- φKO2 : Fago temperado aislado en *Klebsiella oxytoca*
- φHAP-1 : Fago temperado aislado en *Halomonas aquamarina*

## RESUMEN

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria marina que puede asociarse a mariscos, y causar diarrea en humanos. La cepa clonal pandémica de *V. parahaemolyticus* se observó por primera vez en el 2004 en Puerto Montt, décima Región, y desde entonces ha causado aproximadamente 8.000 casos clínicos de diarrea asociados al consumo de mariscos solo en esta región. La masiva proliferación de *V. parahaemolyticus* en esta región ofrece una oportunidad para estudiar los cambios de un patógeno bacteriano en su ambiente natural, mediante la detección y caracterización de variantes que van surgiendo por la evolución de *V. parahaemolyticus* en el mar. Para determinar los cambios ocurridos en *V. parahaemolyticus* en las costas chilenas se caracterizaron bacterias del clon pandémico aisladas de casos clínicos y de mariscos en busca de posibles variantes. El análisis por RFLP-PFGE mostró la presencia de aislados pandémicos conteniendo un fragmento adicional de 42 Kb. Este DNA fue recuperado por extracción alcalina sugiriendo que consistía en un DNA de doble cadena circular y cerrado, que se comportaba similar a un plasmidio. La secuenciación de algunos clones de este DNA mostró una identidad de secuencia nucleotídica de 81 a 99% con el fago VHML de *Vibrio harveyi*. En base a los resultados de la secuenciación se postuló que el plasmidio correspondía a un fago temperado no integrado al cromosoma bacteriano. Esta hipótesis fue apoyada por la inducción con mitomicina C de la lisis con producción de un myovirus, que contiene un DNA de igual tamaño al del plasmidio, pero que no pudo ser recuperado con extracción alcalina, sugiriendo una conformación diferente entre el DNA del fago y el del plasmidio. Las observaciones anteriores indicaron que el plasmidio de 42 Kb correspondería a un fago temperado inducible, denominado VP58.5. En esta tesis se demostró que VP58.5 pertenece al grupo de fagos teloméricos recientemente descritos. Estos fagos se caracterizan por poseer un profago que no se integra en el cromosoma bacteriano y se mantiene como un plasmidio lineal. Este plasmidio es lineal y tiene los extremos covalentemente unidos como una horquilla (denominados telómeros). Durante la infección de la célula bacteriana, el DNA del fago se circularizaría mediante extremos cohesivos, formando un intermediario circular. Una enzima codificada por el fago, la protelomerasa, reconoce y corta el sitio *telRL* y forma

los extremos covalentemente unidos del plasmidio lineal. El plasmidio lineal tiene una organización génica que es 50% permutada o cambiada de posición con respecto al DNA del fago. La caracterización detallada de VP58.5 mostró que este nuevo fago corresponde a un fago telomérico. La permutación circular se comprobó mediante los mapas de restricción del DNA del fago y el plasmidio, mostrando una permutación circular de 35%. Los extremos covalentemente unidos del profago se determinaron por análisis de restricción con la enzima *Bgl*III, determinando aquellos fragmentos que presentan un mayor tamaño al esperado en condiciones desnaturalantes debido a la unión de las hebras complementarias en uno de sus extremos. Estos fragmentos al desnaturalizarse mantienen unidas las 2 hebras por la horquilla, formando así los nuevos fragmentos con el doble de la longitud esperada. La identificación de los extremos cohesivos del fago se realizó determinando aquellos fragmentos de restricción capaces de unirse por sus extremos cohesivos. Estos fragmentos aparecen como bandas de menor intensidad a la esperada, pero se intensifican después de someter el producto de restricción a desnaturación suave para romper la unión por sus extremos cohesivos. La secuenciación del DNA de VP58.5 mostró que tiene 42.612 nucleótidos y una identidad de secuencia aminoacídica de 92% con el fago VHML. Sin embargo, a pesar de tener alta similitud entre VP58.5 y VHML, estos fagos tienen diferencias en el estado del profago, el sitio *telRL* y los extremos del DNA del fago. VHML se integra en el cromosoma bacteriano y los extremos del fago son repetidos invertidos. La comparación del sitio *telRL* entre VHML y VP58.5 mostró que existen 24 bp que no están presentes en la secuencia de VHML. Estas diferencias observadas en estos fagos pueden explicar porqué a pesar de ser fagos mosaicos tan similares que comparten grupos de genes relacionados, su estado del profago es tan diferente. Se encontró que la presencia del profago inducible incrementa la sensibilidad de la cepa pandémica a la luz UV y radiación solar. Las bacterias que contienen el profago son de 7 a 15 veces más sensibles a la radiación UV, al parecer esto es debido a la inducción del fago, ya que el efecto fue revertido al curar las cepas del plasmidio. Las cepas que restablecen la sensibilidad original a la luz UV se hacen sensibles a la infección por VP58.5 formando placas de lisis. VP58.5 tiene un rango de hospedero específico. Infecta formando placas de lisis al



37% de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* probadas, mientras que ninguna de las otras cepas de *Vibrio* sp. probadas fue infectada. Basados en los resultados de esta tesis se postula que el fago temperado telomérico VP58.5 puede tener consecuencias críticas en la persistencia y la propagación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en el mar, debido al aumento en la sensibilidad a la luz UV y solar que generan en las bacterias. Así el fago podría también estar relacionado con las variaciones en la magnitud de los brotes de diarrea asociados con el consumo de mariscos.

## SUMMARY

*Vibrio parahaemolyticus* is a marine bacterium that can be associated with shellfish and cause diarrhea in humans. The *V. parahaemolyticus* pandemic clonal strain was first observed in 2004 in Puerto Montt, X Region, and has since caused approximately 8000 seafood-related diarrhea cases in this region. The massive proliferation of *V. parahaemolyticus* in this region, offering an opportunity to study the changes of a bacterial pathogen in its natural environment, through detection and characterization of bacterial variants that are emerging because the evolution of *V. parahaemolyticus* in the sea. *V. parahaemolyticus* pandemic from clinical and shellfish were analyzed for the detection of variants. The RFLP-PFGE analysis showed the presence of pandemic isolates variants containing an additional fragment of 42 Kb. This DNA is recovered by alkaline extraction, suggesting that consisted of a double-strand DNA circular closed and it was behaving like a plasmid. The sequencing of some clones of this DNA showed nucleotide sequence identity of 81 to 99% with phage VHML found in *Vibrio harveyi*. Based on the results of the sequencing was postulated that the plasmid corresponded to a temperate phage no integrated into the bacterial chromosome. This phage nature of the plasmid was corroborated by the induction with mitomycin C of cell lysis with the production of myovirus containing a DNA of equal size to the plasmid, but which cannot be recovered by alkaline extraction. Suggesting a different conformation of the DNA between the phage and plasmid. The above observations indicated that the plasmid of 42 Kb is a temperate phage that was called VP58.5. The phage VP58.5 seems to correspond to a recently described telomere phages. These phages are characterized by having a prophage that is not integrated into the bacterial chromosome, but it is maintained as a plasmid. This is linear plasmid with covalently closed ends as a hairpin (called telomeres). During infection of the bacterial cell, the phage DNA was circularized through cohesive ends, forming a circular intermediate. An enzyme encoded by the phage, the protelomerase, recognizes and cut the DNA in a site *te/RL* and linked to leave covalently closed ends of the linear plasmid. The linear plasmid has a gene organization that is 50% of permuted with respect the

phage DNA. The detailed characterization of VP58.5 has revealed that this new phage corresponds to a telomeric phage. The circular permutation was evident after mapping the restriction fragments of both DNAs, showing a circular permutation of approximately 35%. The covalently closed ends of the prophage were probed by restriction analysis with enzyme *Bgl*III, identifying those fragments that have a larger length in denaturing conditions due to the bonds between complementary. These fragments in denaturing conditions showed twice the length by the hairpin end, forming the new fragments with double the expected length. The identification of the cohesive ends of phage was performed by determining those restriction fragments that bind by their cohesive ends. These fragments appear as weak bands than expected, but bands acquire the intensity after soft denaturation to break the union by their cohesive ends. The nucleotide sequence of VP58.5 has 42,612 nucleotides and has an amino acid sequence identity of 92% with phage VHML. However, despite the high similarity between VP58.5 and VHML, these phages have several major differences in the prophage state, the site *te*/RL site and the ends of phage DNA. VHML has been reported to integrate into the bacterial chromosome and to possess phage DNA containing ends with inverted terminal repeats. The comparison of this *te*/RL site show that 24 bp present in VP58.5 are absent in VHML. These differences observed in these related phages may explain why despite being so similar mosaic phages that share groups of related genes, their state of the prophage are so different. The presence of inducible prophage increases the sensitivity of the pandemic strain to UV light and solar radiation. Bacteria containing prophage are 7 to 15 times more sensitive to UV radiation, apparently this is due to induction of the phage, because the effect was reversed by plasmid curing. The strains with recovered original sensitivity to UV light are susceptible to infection by the phage VP58.5 forming lysis plaques. VP58.5 has a limited host range. The phage infected 37% of the pandemic strains of *V. parahaemolyticus* tested, while none of the other strains of *Vibrio* sp. tested were infected. Based on the results of this thesis it is likely that the telomere temperate phage VP58.5 can have critical consequences on the persistence and spread of the pandemic strain of *V. parahaemolyticus* in the sea. VP58.5 may have a significant effect on the death rate of pandemic *V. parahaemolyticus* either by direct

infection and lysis of the sensitive strains or by killing of lysogenic bacteria after induction. Its effect on the survival of the pandemic strain may also influence the extent of *V. parahaemolyticus* associated diarrhea outbreaks.

## INTRODUCCION

### 1. Ecología de *Vibrio parahaemolyticus*.

*Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo Gram-negativo, halófilo, que habita en estuarios y ambientes marinos (Alam y col., 2003). 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; Fuenzalida y col., 2006; Hara-Kudo y col., 2003). Antes de 1996, los brotes de diarrea causados por *V. parahaemolyticus* estaban asociados con diversos serotipos. A partir de este año, se observó por primera vez una cepa en el sudeste Asiático que se caracteriza por su capacidad patógena. La mayoría de estas cepas corresponden al serotipo O3:K6, que posee el gen *tdh* y carece de *trh* (Okuda y col., 1997). A partir de 1996, se produjo una rápida diseminación que ha causado una pandemia de gastroenteritis con brotes en varios países, iniciando en el sudeste Asiático y extendiéndose a Asia, América, Europa y África (Ansaruzzaman y col., 2005; Bag y col., 1999; Bhuiyan y col., 2002; DePaola y col., 2003; Martinez-Urtaza y col., 2004).

Las bacterias que hacen parte de este nuevo grupo pertenecen a un mismo clon y son ahora denominadas el clon pandémico de *V. parahaemolyticus* (Matsumoto y col., 2000; Okuda y col., 1997; Wong y col., 2000). 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.,

2004), PCR con partidores arbitrarios (AP-PCR) (Okuda y col., 1997; 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 un marco de lectura abierto *orf8*, asociado a un fago filamentosos (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 dentro de este clon. Se han descrito al menos 21 nuevos serovariantes (O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:KUT, O4:K12, O1:K41, O1:K56, O3:K75, O4:K8, O4:KUT, O5:KUT, O5:K17, O5:K25, O1:K33, O2:K3, OUT:KUT, O3:KUT, O3:K5, O4:K4, O4:K10, O6:K18, UT indica no tipificable) que han emergido del clon pandémico (Laohoprerthisan y col 2003; Nair y col., 2007; Chowdhury y col., 2004). Se han descrito otras variantes que presentan diferencias en PFGE y/o AP-PCR (Chowdhury y col., 2004; Okuda y col., 1997). Otras variantes que carecen del *orf8* (Chowdhury y col., 2004), y algunas variantes que presentan plasmidios de tamaños diferentes, que van desde 1,8 a 140 Kb (Martinez-Urtaza y col., 2004). Recientemente se reportó un nuevo método de alta resolución para distinguir variantes, es el análisis de múltiple locus de secuencias que están repetidas en tándem en el genoma (MLVA-VNTR), el cual permitió la diferenciación de cada uno de los 28 aislados pertenecientes al clon pandémico analizados (Kimura y col., 2008).

## 2. *V. parahaemolyticus* en Chile.

*V. parahaemolyticus* ha causado importantes brotes de diarrea en Chile. El primer brote se registró en 1998 en la ciudad de Antofagasta (23°39'S 70°24'W), con aproximadamente 300 casos clínicos (Córdova y col., 2002), en esta región no se produjeron más brotes en años posteriores. Sin embargo, los brotes de diarrea han continuado en los veranos del 2004 hasta el del 2009 en la región de Puerto Montt (41°29'S 72°24'W). Los casos clínicos fueron 1500 en el 2004, 3600 en el 2005, 900 en el 2006, 475 en el 2007, 1143 en el 2008 y 441 en el 2009 (Cabello y col., 2007; Olea y col., 2005; Fuenzalida y col., 2006; Gonzalez-Escalona y col., 2005; Fuenzalida y col., 2007; Harth y col., 2009) (<http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/elvigia.htm>). Además en el 2005, los brotes se extendieron a todo el país con aproximadamente 11.000 casos, probablemente causados por los mariscos de Puerto Montt, ya que esta región produce cerca del 80% de los mariscos consumidos en las principales ciudades. La mayoría de estos casos han sido causados por la cepa pandémica identificada originalmente en el sudeste Asiático en 1996 (Okuda y col., 1997; Fuenzalida y col., 2006; Gonzalez-Escalona y col., 2005).

Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* se producen cuando la concentración de bacterias patógenas alcanza la dosis infectiva en los mariscos, que al ser consumidos producen el cuadro clínico. La concentración de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar se ve influenciada por cambios en la temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes, por competencia con bacterias no patógenas, y presencia

de depredadores como protozoos y fagos, que pueden matar las bacterias (Comeau y col., 2005; Baros y col., 1978).

### **3. Fagos en las bacterias marinas y su importancia en la Evolución bacteriana.**

El ambiente marino es un gran reservorio de fagos o bacteriófagos, las concentraciones oscilan entre  $10^7$  a  $10^{11}$  partículas virales/ ml de sedimento (Bergh y col., 1989; Wilhelm y col., 1999). Se estima que los fagos contribuyen a determinar la concentración microbiana marina, al ciclo de nutrientes en los océanos y pueden servir como agentes de transferencia génica en el ambiente marino (Fuhrman, 1999; Paul, 1999). Los fagos tienen dos vías de replicación cuando infectan a un hospedero susceptible. Una vía lítica, en el cual el genoma del fago se replica inmediatamente después de la infección y la nueva progenie viral formada es liberada conduciendo a la eclosión de la célula hospedera. En la otra vía lisogénica, el genoma del fago es integrado en el cromosoma de la célula hospedera (denominado profago) y es pasado por la célula hospedera de generación en generación en una forma no infecciosa, hasta que el ciclo lítico es activado (o inducido) por factores como la luz ultravioleta (UV) que provocan la replicación del fago como en el ciclo lítico (Weinbauer y col., 1996).

Los fagos que pueden establecer la lisogenia en un hospedero se denominan temperados, mientras que los fagos que desarrollan el ciclo lítico son llamados virulentos. Así, la producción de fagos temperados es dependiente del número de



bacterias lisogenizadas y la presencia de un agente inductor, mientras que la producción de fagos virulentos depende del encuentro de fagos virulentos con su célula hospedera.

Steward y col, (1984) han postulado dos hipótesis para explicar las ventajas de la lisogenia. La primera plantea que las células lisogenizadas son inmunes a la infección por la misma cepa de fagos y entonces tienen una ventaja competitiva sobre células no lisogenizadas, que pueden ser infectadas y lisadas. La segunda hipótesis postula que la lisogenia permite su supervivencia al mantener las poblaciones de fagos cuando la abundancia del hospedero es baja, y esto puede ser dado cuando han existido infecciones líticas que han disminuido la concentración del hospedero (Steward y col., 1984). Además de las ventajas proporcionadas a la célula hospedera, los profagos pueden ser también “bombas de tiempo”, que frecuentemente resultan en la lisis del hospedero (Paul, 2008).

Recientemente con los análisis fisiológicos unidos a los análisis de expresión de genes, se ha postulado que los profagos pueden potenciar el *fitness* (o desarrollo) del hospedero (Brussow y col., 2004). Los genes del profago que promueven el *fitness* del hospedero, son denominados factores *fitness* y se han postulado 4 mecanismos en los cuales están involucrados: 1) los profagos sirven como puntos de anclaje para re-arreglos génicos, debido a que frecuentemente funcionan como transposones; 2) los profagos pueden interrumpir genes a través de inserciones, produciendo pérdidas metabólicas por el silenciamiento de funciones génicas no esenciales; 3) conferir

inmunidad a las infecciones por fagos relacionados; 4) producir la lisis de cepas cercanamente relacionadas (Paul, 2008). Estos factores *fitness* son genes no esenciales para el ciclo de vida del fago y también son llamados factores de conversión lisogénica (Brussow y col., 2004).

Existen agentes químicos, físicos y factores ambientales (ej. mitomicina C, luz UV y la hambruna) que pueden inducir la replicación de los fagos. Estos agentes producen un daño en el DNA, que activa el sistema SOS bacteriano. El sistema SOS es un sistema global regulatorio en respuesta a daños en el DNA (Campbell, 2006). Cuando el DNA es dañado por irradiación o por otro medio, un DNA de simple hebra es formado como producto del daño. Este DNA de simple hebra activa la proteína RecA, que tiene actividad coproteasa y promueve la recombinación homóloga para reparar el DNA dañado. La actividad coproteasa de RecA, promueve la ruptura de la proteína LexA. Esta ruptura de LexA promueve la síntesis de genes cuyos productos es reparar y recuperar el DNA dañado. A parte de promover la ruptura de LexA, RecA produce la ruptura de la proteína represora del fago, que mantiene reprimidos los genes de la lisis y promueve la lisogenia. Al romper este represor, se induce al profago a entrar al ciclo lítico (Campbell, 2006).

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). En 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). Stopar y col., (2004) encontraron que el 71% de las bacterias aisladas del Golfo de Trieste estaban lisogenizadas. En 130 aislados obtenidos del Mar Báltico se encontró que el 28% contiene profagos inducibles (Leitet y col., 2006). Estos resultados indican que entre las bacterias marinas aisladas, aproximadamente la mitad contienen profagos inducibles, que pueden tener un importante efecto en la mortalidad bacteriana, el flujo de nutrientes y la diversidad de especies (Paul, 2008; Weinbauer y col., 1996).

#### 4. Fagos Teloméricos.

La mayoría de los fagos temperados se integran en el genoma del hospedero, durante la lisogenia. Sin embargo, algunos fagos como el fago P1 de *Escherichia coli* (Ikeda y Tomizawa, 1968), el fago cp32 de *Borrelia burgdorferi* (Eggers y Samuels, 1999) y el fago LE1 de *Leptospira biflexa* (Girons y col., 2000), no se integran en el genoma del hospedero, pero existen como plasmidios con un bajo número de copias. Recientemente se describió un nuevo grupo de fagos teloméricos, que tienen un DNA de doble hebra lineal con los extremos de simple hebra o cohesivos, y donde el profago es un plasmidio lineal con los extremos 3' y 5' unidos covalentemente formando una horquilla (denominados telómeros). El estudio de los fagos teloméricos fue iniciado por el aislamiento del fago N15 en *E. coli*, por Victor Ravin en Moscú, Rusia en 1964 (Svarchevsky y Rybchin, 1984). Otros fagos que hacen parte de este grupo son los fagos PY54 de *Yersinia enterocolitica*,  $\phi$ KO2 de *Klebsiella oxytoca*,  $\phi$ HAP de *Halomonas aquamarina* y VP882 de *V. parahaemolyticus* (Hertwig y col., 2003a; Casjens y col.,

2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009). Los fagos N15, PY54,  $\phi$ KO2 tienen morfología de siphovirus y fueron aislados de enterobacterias, mientras que  $\phi$ HAP y VP882 son myovirus, aislados de bacterias marinas. Los plasmidios lineales con los extremos covalentemente unidos son inusuales en enterobacterias y bacterias marinas, pero han sido aislados en actinomicetes, principalmente en *Streptomyces* (Kinashi y col., 1987), en *Borrelia* (Plasterk y col., 1985) y en *Agrobacterium tumefaciens* (Jumas-Bilak y col., 1998). El fago N15 ha sido estudiado en mayor detalle, la siguiente sección se enfoca en las características de este fago como modelo de estudio de los fagos teloméricos.

#### 4.1. Estructura de los DNAs del plasmidio y fago N15.

El análisis de los DNAs del plasmidio y el fago N15 mostró que: 1) ambas moléculas de DNA son lineales; 2) los mapas de restricción son circularmente permutados; y 3) los dos DNAs tienen el mismo tamaño. Los fagos teloméricos se caracterizan por tener un DNA de doble hebra con extremos cohesivos que sobresalen en el extremo 3' o 5'. Estos extremos cohesivos han sido designados *cosL* y *cosR* (Rybchin y Svarchevsky, 1999). El profago, como se mencionó anteriormente, es un plasmidio lineal con los extremos unidos mediante un enlace covalente 5'fosfato - 3'OH entre las hebras complementarias, formando una horquilla o "hairping" en cada extremo. Los extremos unidos covalentemente del profago han sido denominados telómeros, y han sido llamados *telL* y *telR* (Rybchin y Svarchevsky, 1999).

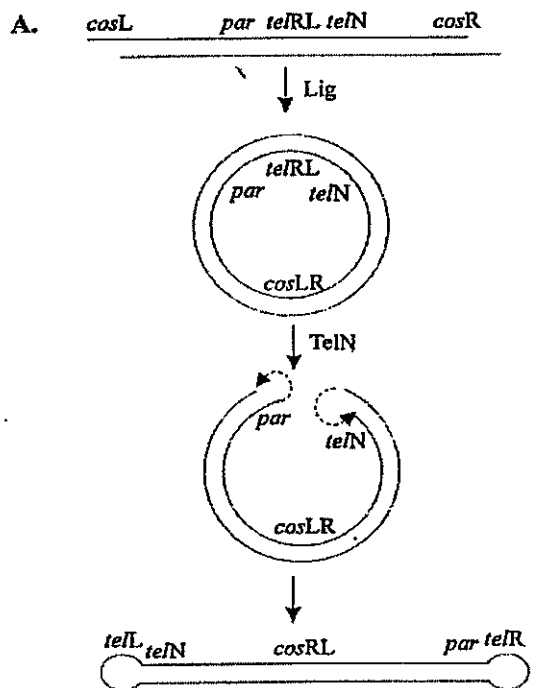
#### **4.2. Conversión y generación del plasmidio lineal.**

La formación del plasmidio lineal es realizada por la enzima protelomerasa codificada por el fago, durante la infección de la célula bacteriana (Deneke y col., 2000). Cuando el fago infecta una célula bacteriana, los extremos de simple hebra o cohesivos se ligan formando un intermediario circular. Este intermediario es sustrato para el corte realizado por la protelomerasa que genera así el plasmidio lineal (Rybchin y Svarchevsky, 1999). La protelomerasa tiene una actividad de cortar y unir (cleaving/joining), y la secuencia blanco es una secuencia de DNA palindrómica invertida repetida, llamada sitio de resolución del telómero (*site teIRL*) ubicada en el centro del genoma del fago N15 (Ravin, 2003). Después de cortar el sitio *teIRL*, se generan extremos de simple hebra complementarios que son re-alineados sobre sí mismos, la protelomerasa une cada extremo con los extremos 3' y 5' de las hebras complementarias, formando dos nuevos enlaces fosfodiéster, y generando así las horquillas en cada extremo del profago (Fig. 1). La molécula resultante es un profago tipo plasmidio lineal con los extremos de las hebras complementarias unidos covalentemente (Rybchin y Svarchevsky, 1999; Malinin y col., 1992).

#### **4.3. Características de la protelomerasa.**

La protelomerasa, denominada así por una telomerasa de procariontes, es la enzima que forma los telómeros (Rybchin y Svarchevsky, 1999). La protelomerasa del fago N15, es una enzima tipo tirosin recombinasa y es un análogo funcional de la

integrada del fago lambda, debido a que estas enzimas juegan un papel similar en el establecimiento de la lisogenia (Mardanov y Ravin, 2009; Hertwig, 2007). Estas enzimas tienen mecanismos catalíticos similares para cortar y ligar el DNA, generando un 3' fosfotirosina en el intermediario de DNA, que permite la unión covalente de las hebras del DNA clivadas, sin usar un cofactor de alta energía. Dos moléculas de protelomerasa se unen como un dímero al DNA de doble cadena, reconocen el sitio *telRL* y generan un corte que deja los extremos de simple hebra (Mardanov y Ravin, 2009). Las dos moléculas de la protelomerasa se unen transitoriamente al extremo 3' del DNA cortado, dejando libre el extremo 5'. Seguidamente un nuevo enlace fosfodiéster con la cadena complementaria es generado, para formar las horquillas en los extremos (Mardanov y Ravin, 2009; Hertwig, 2007). A parte de la conversión del DNA del fago en un plasmidio lineal, la protelomerasa participa en la replicación del profago (Ravin, 2003). La replicación del profago N15 es iniciada desde un sitio *ori* localizado dentro del gen *repA*, seguido de un modo de replicación  $\theta$  y prosiguiendo bidireccionalmente. La replicación bidireccional resulta en la formación de dímeros circulares cabeza-cabeza y cola-cola. La protelomerasa corta los telómeros duplicados generando dos moléculas plasmidios lineales con los extremos covalentemente unidos (Ravin, 2003).



B. 5'-R-CCATTATACGCGGTATAATGG-L-3'  
3'-R'-GGTAATATGCGGCATATTACC-L'-5'

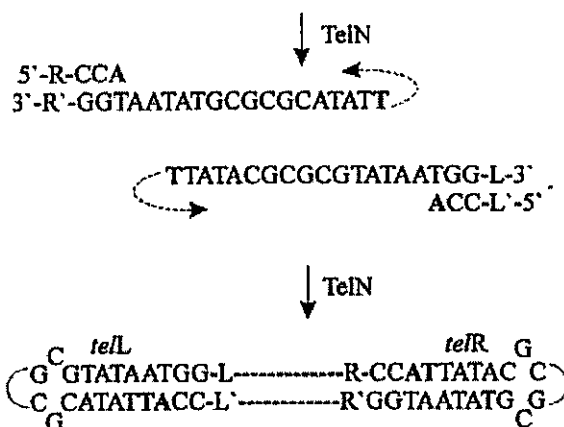


Figura 1. Mecanismo de conversión del DNA del fago N15 al profago tipo plasmidio lineal. (A) Después de la infección de la célula bacteriana, el genoma del fago se circulariza por sus extremos cohesivos (*cosR* y *cosL*). La molécula circular es entonces cortada por la protelomerasa (TelN) en el sitio de resolución del telómero (*telRL*). Los extremos de simple hebra generados, son realineados sobre sí mismos y unidos por la protelomerasa, formando un plasmidio lineal con los extremos unidos covalentemente. (B) Procesamiento del sitio *telRL* a nivel molecular. AT indica el sitio donde la protelomerasa realiza el corte dejando los extremos de simple hebra; L y R indica los brazos del sitio *telRL* que formarán los telómeros derecho (R) e izquierdo (L); Lig, DNA ligasa bacteriana; TelN, protelomerasa; *par*, proteína de partición.

#### 4.4. Organización genómica de los fagos Teloméricos.

Los fagos N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP y VP882 han sido secuenciados completamente (Ravin y col., 2000; Hertwig y col., 2003b; Casjens y col., 2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009). A pesar de tener morfologías y orígenes distintos, estos fagos teloméricos tienen una organización genómica y algunas proteínas similares. La organización genómica reveló que en estos fagos los genes están situados en dos brazos llamados derecho e izquierdo, separados por el sitio *telRL*. En el brazo izquierdo están ubicados los genes estructurales que codifican para las proteínas del ensamble de la cabeza y cola, las proteínas terminasas para el empaquetamiento del DNA, y la proteína de partición (*parA*), que es responsable del mantenimiento del plasmidio asegurando que cada célula hija tenga una copia del plasmidio. En el brazo derecho están ubicados los genes que codifican para las proteínas de inmunidad, de replicación (*RepA*), y la protelomerasa (Casjens y col., 2004; Hertwig y col., 2003b; Ravin y col., 2000). Existe un fago aislado en *Vibrio harveyi*, el VHML (*Vibrio harveyi* miovirus like) (Oakey y col., 2000), el cual no ha sido reportado como fago telomérico, pero contiene la protelomerasa y la proteína *RepA* (Oakey y col., 2002). El fago VHML tiene una morfología tipo myovirus, similar a la observada en VP882 y  $\phi$ HAP-1, pero aparte de ser un myovirus y estar presente también en una bacteria marina, VHML no es cercanamente relacionado a estos fagos (Mobberley y col., 2008). Se ha postulado que el fago VHML se integra en el genoma del hospedero (Oakey y col., 2000; Oakey y col., 2002) pero no existe evidencia científica que pruebe este hecho.



La situación descrita en Chile donde se han observado una gran cantidad de casos de diarreas producidos por el consumo de mariscos contaminados con *V. parahaemolyticus*, muestra una rápida y masiva proliferación de esta bacteria en el país, que ofrece una oportunidad para entender y estudiar los cambios de este patógeno bacteriano en su ambiente natural, mediante la detección y caracterización de bacterias variantes que han ido surgiendo por la evolución de *V. parahaemolyticus* en el mar.

En esta Tesis se postuló la siguiente hipótesis:

La población pandémica de *V. parahaemolyticus* que llegó a Chile consistió de una cepa, que durante el tiempo transcurrido en las costas chilenas se ha diversificado generando variantes.

El objetivo general fue:

Caracterizar un grupo de variantes del clon pandémicos conteniendo un plasmidio de 42 Kb.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Aislamiento y caracterización de *V. parahaemolyticus* de muestras clínicas y ambientales.

Las muestras de mariscos fueron recolectadas en Puerto Montt y Antofagasta durante los veranos de 1998 y del 2004 al 2009, según (Fuenzalida y col., 2006; Fuenzalida y col., 2007; González-Escalona y col., 2005). Los mariscos se tomaron directamente de los sitios de crecimiento y fueron procesados en un tiempo de no más de 4 horas después de la recolección. El enriquecimiento, aislamiento y caracterización se realizó como describe el Manual de Bacteriología Analítica del FDA (Food and Drug Administration, US) (Kaysner y col., 2004). Brevemente, 10 especímenes fueron macerados mediante una picadora mini primer (Phillip). Se tomó 50 g del macerado y se homogenizó en 450 ml de solución amortiguadora de fosfato salino. El homogenizado fue sembrado en diferentes concentraciones en series de 3 tubos conteniendo agua peptonada alcalina (Alkaline Peptone Water, APW) y se incubaron toda la noche a 37°C. Todos los tubos que mostraron crecimiento bacteriano fueron analizados para determinar la presencia de *V. parahaemolyticus* mediante amplificaciones por PCR de los genes *tlh*, *tdh* y *trh* (Bej y col., 1999). Los tubos se analizaron también para determinar *V. parahaemolyticus* pandémico, por la presencia de *orf8* (Laohaprerthisan y col., 2003) y *toxRS/new* (Matsumoto y col., 2000). Las cargas de *V. parahaemolyticus* total y pandémico fueron calculadas con las tablas de número más probable NMP (Kaysner y

col., 1998), en base a las amplificaciones para PCR positivas de los genes *tlh* y *tdh*. El aislamiento bacteriano se realizó mediante la siembra de 0,1 ml de cultivo de los tubos que mostraron crecimiento bacteriano, en agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) e incubados toda la noche a 37°C.

*V. parahaemolyticus* de muestras clínicas fue obtenido por hisopado rectal de pacientes que consultaron por diarrea aguda y que fueron atendidos en el Hospital Regional de Puerto Montt durante los meses de los brotes de diarrea (González-Escalona y col., 2005). El aislamiento, crecimiento y caracterización de los aislados de origen clínico se realizó según lo indica Fuenzalida y col. (2006)

## **2. Cepas y condiciones de cultivo.**

La cepa de *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 (VpKX) fue obtenida del Instituto de Investigación para enfermedades microbianas (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan). 503 cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas obtenidas de brotes de diarrea y de mariscos en Chile fueron incluidas en este estudio. El aislamiento y caracterización de las cepas se desarrolló según Fuenzalida y col. (2006).

Las cepas de *V. parahaemolyticus* fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con 3% NaCl (p/v), las placas de agar contenían 1,5% (p/v) de Select agar (Invitrogen, CA) y los agares blandos 0,6% (p/v) de select agar (Invitrogen, CA).

### 3. Análisis de DNA.

Las cepas usadas en esta tesis fueron seleccionadas de la colección de cepas de *V. parahaemolyticus* del Laboratorio de Biotecnología, INTA. De las 503 cepas utilizadas en este estudio, 303 cepas fueron analizadas por análisis directo del genoma con enzimas de restricción (DGREA), 75 cepas por polimorfismo en el largo de los patrones de restricción mediante electroforesis en gel en campo pulsante (RFLP-PFGE) y 125 cepas mediante extracción alcalina de DNA (Tabla 1). Los DGREAs fueron realizados usando la enzima *NaeI* según lo indicado por Fuenzalida y col. (2006). Los PFGE-RFLP se realizaron con las enzimas de restricción *NotI* y *ICeu-I* (Hara-Kudo y col., 2003) y se utilizó el sistema CHEF-DRII system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) (Fuenzalida y col., 2006).

Tabla 1. Origen de las cepas de *V. parahaemolyticus* usadas en el estudio y el método usado para el análisis.

Origen de las cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> pandémicas	RFLP- PFGE	DGREA	Extracción de DNA con lisis alcalina
Sudeste Asiático	0	0	12
Antofagasta 1998	13	11	13
Puerto Montt 2004	11	28	13
Puerto Montt 2005	30	186	13
Puerto Montt 2006	21	78	21
Puerto Montt 2007	0	0	27
Puerto Montt 2008	0	0	13
Puerto Montt 2009	0	0	13

La presencia o ausencia del DNA extracromosomal de 42 Kb fue analizada por dos métodos: PFGE sin enzimas de restricción y por extracción de DNA con lisis alcalina. El PFGE fue realizado según lo descrito por (Fuenzalida y col., 2006). La extracción alcalina de DNA fue realizada usando el Plasmid Mini Kit (Omega Bio Tek). La diversidad del DNA extracromosomal fue determinada basada en los patrones de restricción del DNA extracromosomal de 42 Kb con la enzima *ApaI* (Fermentas), como lo describe el fabricante y los fragmentos fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata (Espejo y col., 1998).

#### 4. Aislamiento y purificación del fago VP58.5.

La cepa PMC58.5 que contiene el profago VP58.5 fue usada como cepa tipo y el fago fue recuperado desde esta cepa. La cepa PMC58.5 fue sembrada en caldo LB con

3% de NaCl e incubada a 37°C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. El cultivo fue dividido en dos alícuotas, una alícuota fue tratada con 30 ng/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich), mientras que la otra alícuota fue usada como cultivo control. Los cultivos fueron incubados nuevamente en agitación a 37°C y la  $DO_{600nm}$  fue medida cada media hora. La lisis celular fue indicada por la disminución de la  $DO_{600nm}$  en el cultivo tratado con mitomicina C al ser comparada con el cultivo control no tratado, indicando la replicación viral (Oakey y col., 2000). Para recuperar las partículas virales libres de bacterias, se centrifugó el cultivo lisado a 5.000 x g por 10 minutos, y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro con un poro de 0,2  $\mu m$ . El filtrado fue concentrado a 140.000 x g por 50 minutos, en el rotor 55,2 Ti de una ultracentrífuga (Beckman, CA). El concentrado de fagos o pellet, fue resuspendido en agua de mar sintética (23,4 g/L NaCl, 24,7 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,5 g/L KCl, y 1,43 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , pH 6,5; 100  $\mu l$  por 40 ml de cultivo lisado) (Zabala y col., 2009a), y purificado a través de un gradiente de densidad (1,3 a 1,7 g/ml) en cloruro de cesio (CsCl), como describe Sambrook y col., (2001).

##### **5. Extracción y caracterización del DNA del fago VP58.5.**

Para extraer el DNA del fago VP58.5, el "pellet" de fagos resuspendido en agua de mar sintética fue incubado con DNAsa I (2  $\mu g/ml$ ) y RNAsa A (100  $\mu g/ml$ ) (Winkler), por 2 horas a 37°C. Seguidamente para la extracción del DNA, la suspensión de partículas de fagos fue tratada con 500  $\mu g/ml$  de proteinasa K (Sigma) por 15 minutos

a 37°C, SDS a una concentración final de 0,5 % (p/v), y la solución se incubó a 65°C por una hora para romper la cubierta proteica del virus. La extracción se realizó por el método de Fenol-Cloroformo. El DNA fue precipitado por la adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,0) y 2 volúmenes de etanol al 100 % a -20°C. El "pellet" de DNA se lavó con etanol al 70 %. Se dejó secar a temperatura ambiente y luego el DNA del fago se resuspendió en el buffer TE 1X (0,01 M Tris, 0,001 M EDTA, pH 7,5) (Zabala y col., 2009a).

#### **6. Clonación, amplificación por PCR y secuenciación de los clones.**

La clonación fue realizada con el kit TOPO Shotgun Subcloning (Invitrogen) usando el DNA extracromosomal de 42 Kb obtenido por extracción con lisis alcalina. Los clones fueron secuenciados por Macrogen (Seoul, Korea) usando los partidores M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Las amplificaciones por PCR de los genes del fago VHML de *V. harveyi* fueron realizadas con los partidores listados en la Tabla 2. Estos partidores fueron diseñados en base a la secuencia nucleotídica publicada de este fago (Oakey y col., 2002), utilizando el programa Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net>).

Tabla 2. Lista de partidores para las ampliaciones por PCR de ORFs identificados en el fago VHML y clones del plasmidio de 42 Kb.

Primer	Secuencia
VHML ORF 1F	GGCGAACACATCAAGGAACT
VHML ORF 1R	TTTCCACCTTGGAAATCAAGC
VHML ORF 23F	CAAAGGGGGTATTTCGTTTCA
VHML ORF 23R	CCGACAGAACTGGTGAATGA
VHML ORF 24F	CGGTGATTACAAAGCGGATT
VHML ORF 24R	CGGGTCAGTGGTATGGTTTT
VHML ORF 30F	TATGCAGGGGCTCCAAATAG
VHML ORF 30R	ATTTTTGCGGCAGTCACATC
VHML ORF 34F	CTTTTGGCGACATGGCTTAC
VHML ORF 34R	GCTTTCCATAACTCCGCATC
VHML ORF 39F	AATACCTACACGGCGCAGAA
VHML ORF 39R	GAAGGCGGCTGGATAATATG
VHML ORF 40F	AATCCGAGCAATGAACCTGT
VHML ORF 40R	CCCGGTTCGATTTTTAGTCT
VHML ORF 52F	AGCATTGTTCCACTCGCTTC
VHML ORF 52R	GGCCGCAAACCTGGTTATTTA
42-Kb Seq 37F	CATTTTATCGGCGGCATAGT
42-Kb Seq 37R	CTTAAAGTGCAGGGGTCTGAT
42-Kb Seq 22F	GCCTATTCCTTCCAGCCTTA
42-Kb Seq 22R	AGCATTGGCGAGATTTTCATC

ORF: Marcos de lectura abiertos.

Para las reacciones de amplificación por PCR, aproximadamente 10 ng de DNA bacteriano fueron incubados con una concentración de 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 0,05 U/μl de *Taq* polimerasa. Los ciclos consistieron en



un ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificación de 94°C, 60°C y 72°C por un minuto cada uno, y un ciclo final de 72°C por 5 minutos. Los amplificadores fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata (Espejo y col., 1998). Estos amplificadores fueron secuenciados por MacroGen usando los partidores forward y reverse listados en la Tabla 1 (Zabala y col., 2009a).

## **7. Inducción con lámpara de luz UV.**

Para los experimentos de inducción con luz ultravioleta (UV), 50 ml de cultivo bacteriano de las cepas PMC58.5 (con el profago VP58.5) y PMA37.5 (sin el profago), fueron crecidas hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. Luego los cultivos fueron puestos en una caja de Petri en agitación y fueron irradiados con una lámpara de 6W y longitud de onda de 310 nm, por 12,5 minutos. La lámpara se ubicó a una distancia de 25 cm sobre la caja de Petri y la irradiación se realizó al interior de una cabina de bioseguridad. Después de la irradiación los cultivos fueron incubados nuevamente en agitación a 37°C y la  $DO_{600nm}$  fue medida cada media hora. La lisis celular fue evidenciada por la disminución de la  $DO_{600nm}$  al ser comparada entre los cultivos de PMC58.5 y PMA37.5 (Zabala y col., 2009a).

Las tasas de muerte específica fueron calculadas desde las curvas de sobrevivencia obtenidas después de la irradiación con luz UV, en las mismas condiciones que se realizó la inducción, excepto que las bacterias fueron diluidas a  $10^4$  UFC/ml en agua de

mar sintética. La intensidad de la irradiación UV en la caja de Petri fue de 0,18 W/m<sup>2</sup>, y fue medida con el actinómetro yoduro/iodato según (Rahn y col., 2006).

#### **8. Inducción con irradiación solar.**

La irradiación solar fue realizada en las mismas condiciones que las irradiaciones con luz UV, excepto que los cultivos fueron expuestos al sol de medio día en un ambiente abierto por 2 horas. Para evitar la contaminación con partículas, un flujo de aire filtrado ascendente fue mantenido durante la irradiación. Basados en la observación de la disminución del volumen observado en las paredes de la placa de Petri, el agua que se evaporó durante la irradiación, fue remplazada por adición de agua destilada. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinada por la siembra de una alícuota del cultivo irradiado en agar blando, pero con una modificación al método en placa de Rahn y col., (2006). 1ml de cada dilución del cultivo irradiado fue mezclado con 9 ml de medio LB con 3 % de NaCl y 1,5% de agar a 45°C e inmediatamente vertido sobre una placa de Petri. Una vez gelificado, el agar fue cubierto con 10 ml de medio LB con 3% de NaCl y 1,5% de agar a 45°C, para que las bacterias no sumergidas, no se dispersen en la superficie del agar. Luego de que el agar se endureció, las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C (Zabala y col., 2009a).

## 9. Curación de plasmidios.

La curación del plasmidio de 42 Kb fue realizada por el crecimiento de PMC58.5 en caldo LB con 3% de NaCl conteniendo 150 µg/ml de naranja de acridina (acridine orange, AO) (Merck), incubado a 37°C, con agitación y en oscuridad, según Keyhani J., y col (2006). De este cultivo tratado con naranja de acridina, se tomo 0,01 ml y se sembró en placas de LB con 3% de NaCl y 1,5% de agar, se incubó toda la noche a 37°C. 10 colonias fueron probadas para detectar la presencia del plasmidio de 42 Kb, mediante amplificaciones por PCR para 5 genes del plasmidio (protelomerasa, proteína de cápside, proteína portal, proteína contráctil de la vaina y proteína del plato-base). Se encontraron 2 colonias que carecían de los genes del plasmidios. Las bacterias curadas del plasmidio también fueron obtenidas por análisis de bacterias sobrevivientes después de la irradiación con luz UV a una sobrevida de 0,05% (Zabala y col., 2009a).

## 10. Microscopía electrónica.

La microscopía electrónica fue realizada usando el lisado de bacterias inducidas con mitomicina C. Al cultivo inducido se le retiró el debris celular por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos y se filtró a través de filtros con poros de 0,2 µm. Las muestras fueron puestas sobre una grilla o rejilla de cobre de 400 mesh recubiertas de carbón-pioloform. Las grillas fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2% (p/v) en buffer HEPES. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JOEL, Tokio, Japan) a 80 kV.

## 11. Mapa de restricción.

El mapa de restricción fue realizado por digestión de los DNAs del fago y profago VP58.5 con las enzimas de restricción *NheI*, *HindIII* y *SphI* (New England Biolabs), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles al 0,4% de agarosa (Winkler), por 15 horas a 20 V, usando un marcador de DNA de alto peso molecular (Invitrogen, CA) para distinguir entre fragmentos de mayor tamaño de 10 Kb. Se analizaron también por electroforesis en geles al 1% de agarosa por 2 horas a 70 V, y se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb (Fermentas), como marcador de los fragmentos de menos de 10 Kb. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio.

## 12. Determinación de los extremos cohesivos del fago.

Para determinar los extremos cohesivos, el DNA del fago fue digerido con la enzima de restricción *Van9II* (Fermentas). Los fragmentos de restricción obtenidos fueron analizados con y sin calentamiento a 60°C por 10 minutos e inmediatamente enfriados en hielo por 5 minutos antes de ser cargados en geles de agarosa al 0, 8% y teñidos con bromuro de etidio. Para confirmar que estos extremos eran en sí cohesivos (podían ligarse), el DNA del fago fue tratado con DNA ligasa, luego digerido con *Van9II* y analizado como descrito con el procedimiento anterior. Los extremos cohesivos del fago fueron secuenciados usando los partidores *cos-F* (5'-

CAGTAAAGTCCCAATCGCTC) y *cos-R* (5'-GTCCATTCCGTCAGTTAGTTTC) (Zabala y col., 2009b).

### 13. Determinación de los extremos covalentemente unidos del profago.

Los extremos covalentemente unidos del DNA del profago fueron analizados mediante digestión con la enzima de restricción *Bgl*II. Los fragmentos digeridos fueron resueltos en condiciones no desnaturalantes, en geles al 0,8% de agarosa. Los fragmentos digeridos se analizaron también con desnaturalación alcalina. La desnaturalación alcalina se realizó en geles al 0,8% de agarosa con 50 mM NaCl y 1 mM EDTA. El gel fue sumergido en una solución amortiguadora alcalina conteniendo 30 mM NaOH y 1 mM EDTA, durante 30 minutos antes de cargar las muestras. Las muestras de DNA fueron mezcladas con un buffer de carga alcalino suplementado con 50 mM NaOH y 1 mM EDTA. La electroforesis fue realizada a 40 voltios por 3 horas. Las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio (Hertwig y col., 2003a; Zabala y col., 2009b).

### 14. Secuenciamiento del genoma de VP58.5 y análisis de secuencia.

Basados en la identidad de secuencia nucleotídica entre 81 a 99 %, de los fragmentos de DNA del fago VP58.5 con VHML, se diseñaron 135 partidores deducidos de la secuencia genómica publicada de VHML (Anexo 1). Los partidores diseñados se

usaron para el secuenciamiento directo usando el DNA del fago y profago como templados (Oakey y col., 2002 y Zabala y col., 2009b). Cien a 200 ng del DNA del fago purificado en gradiente de CsCl fue usado como templado y secuenciado por QIAGEN (GmbH, Germany). El DNA del profago secuenciado fue extraído con lisis alcalina y purificado con un gradiente de densidad en CsCl con bromuro de etidio (Sambrook y col., 2001). Los Gaps entre los contigs fueron llenados por "primer walking". La estrategia de secuenciamiento directo también fue usada para la determinación de los extremos cohesivos.

Los análisis de secuencia y alineamientos se realizaron con el software MacVector™ 8.0 del Oxford Molecular Group (Campbell). Los marcos de lectura abiertos (ORFs) fueron identificados usando los algoritmos de los software de MacVector, Accelrys Gene v2.5 (Accelrys Inc) y ORF Finder (NCBI). La búsqueda de BLAST fue realizada en la página web de NCBI (GenBank database) usando BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para calcular los valores de similitud e identidad (Altschul y col., 1997).

#### **15. Geles SDS-PAGE y análisis de las proteínas por espectrometría de masas.**

Las proteínas estructurales del fago VP58.5 se analizaron mediante geles SDS-PAGE según Sambrook y col., 2001. Las partículas virales de VP58.5 fueron purificadas con un gradiente de densidad con CsCl. Estas partículas virales purificadas fueron mezcladas con tampón de carga suplementado con 50 mM Tris-Cl (pH 6,8), 100 mM

dithiothreitol, 2 % (p/v) SDS, 0,1 % azul de bromofenol y 10% de glicerol. Las muestras fueron calentadas a 100°C por 5 minutos y luego fueron separadas en geles SDS-PAGE al 12% (p/v). Las proteínas fueron visualizadas por tinción con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad). Las bandas fueron escindidas con un bisturí estéril, lavadas dos veces con acetonitrilo al 50% (v/v) en bicarbonato de amonio 5 mM por 1 hora, digeridas con tripsina porcina (Merck) (Herwig y col., 2003a). Para el análisis de las proteínas, una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masa fue utilizada. Para determinar las secuencias peptídicas, el espectro de masas se obtuvo usando un espectrómetro de masa QStar XL hybrid (Applied Biosystems).

#### **16. Números de acceso a las secuencias nucleotídicas.**

Las secuencias de los clones y amplificados del fago fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso EU647248 a EU647255. La secuencia nucleotídica completa de VP58.5 fue depositada bajo el número de acceso FN297812. Los números de acceso de los genomas de fagos usados en esta tesis son: VHML, NC\_004456; VP882, NC\_009016;  $\phi$ HAP-1, EU399241; N15, NC\_001901;  $\phi$ KO2, NC005857 y PY54, NC\_005069 (Oakey y col., 2002; Lan y col., 2009; Mobberley y col., 2008; Ravin y col., 2000; Casjens y col., 2004; Hertwig y col., 2003b).

### 17. Ensayos de infección con el fago VP58.5.

Los ensayos de infección con VP58.5 se realizaron mediante método del doble agar y ensayo por microgota. Para el método del doble agar, 1 ml de cultivo de la cepa indicadora a una  $DO_{600nm}$  0,5 fue mezclada con 100  $\mu$ l de diluciones del fago, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente el cultivo infectado fue mezclado con 3 ml de medio LB con 3% NaCl y 0,6% agar a 45°C y agitado en vortex e inmediatamente esparcido sobre un placa de Petri con una base de medio sólido (20 ml de LB con 3 % NaCl y agar 1,5 %). Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, luego se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. La presencia de fagos en la muestra se determinó por la observación de unidades formadoras de placa de lisis (UFP). Las cepas usadas en los ensayos de infección están descritas en el Anexo 3.

Para los ensayos por microgota, 1 ml cultivo de la cepa indicadora, crecido a una  $DO_{600nm}$  0,5 se mezcló con 3ml de LB con 3% NaCl y 0,6% agar a 45°C. Se agitó en vortex e inmediatamente se esparció sobre una placa de Petri con 20 ml de LB con 3% NaCl y 1,5% agar y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente una gota de 10  $\mu$ l de diferentes diluciones del fago se adicionó sobre el cultivo. Después que la gota se secó, se incubó a temperatura ambiente toda la noche. Los fagos fueron detectados por la observación de placas de lisis en la zona de la gota.



### 18. Estudio de la lisogenización por el fago VP58.5.

Las cepas lisogenizadas se obtuvieron por el ensayo de infección por microgota y se analizaron 25 cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas. Se tomaron las bacterias que crecían en la zona de la lisis. Estas bacterias fueron crecidas en caldo LB con 3 % de NaCl y se analizaron para la formación de placas de lisis con el lisado de VP58.5 mediante ensayo por microgota, como se describió anteriormente. La presencia del DNA del profago en las cepas resistentes fue confirmada por extracción de DNA por lisis alcalina y la inducción del profago con mitomicina C. Las cepas utilizadas en la infección están descritas en el Anexo 3.

### 19. Rango de Hospedero.

Se analizó la susceptibilidad de infección por el fago VP58.5, utilizando el método de microgota. Se analizaron 27 cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas, 47 cepas de *V. parahaemolyticus* no pandémicas y 15 cepas de *Vibrio* sp, (Tabla 7 y Anexo 3). Como control de infección se utilizó la cepa sensible PMC58.5 Curada con UV (PMC58.5-UVC) y medio LB con 3 % NaCl sin el fago VP58.5.

### 20. Inducción en hambruna.

Para la inducción en hambruna, 50 ml de cultivo de la cepa PMC58.5 fueron crecidos en LB con 3 % de NaCl hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,5. Luego el cultivo se

concentró a 5.000 x g por 10 minutos y el "pellet" se resuspendió en 50 ml de agua de mar sintética. Se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Al siguiente día el cultivo se concentró a 5.000 x g por 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro con un poro de 0,2 µm. Seguidamente, se realizaron ensayos de infección por microgota con la cepa sensible PMA37.5.

## RESULTADOS

### 1. Caracterización de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

#### 1.1. Detección de variantes en cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

La determinación de los cambios genéticos ocurridos en *V. parahaemolyticus* en las costas chilenas, se realizó mediante caracterización de bacterias variantes, aislados con las características típicas de la cepa pandémica como la presencia de los genes *tdh*, *orf8*, *toxRS/new* y la ausencia del gen *trh*. Estas bacterias fueron obtenidas de mariscos y de casos clínicos ocurridos en el norte el año 1998, y en el sur de Chile desde el 2004 al 2009. Se analizaron 303 cepas de *V. parahaemolyticus* pandémico mediante DGREA (con la enzima de restricción *NaeI*) y 75 cepas por RFLP-PFGE (con las enzimas *NotI* y *ICeu-I*) en busca de posibles variantes. Se detectaron 16 aislados variantes, que fueron distinguidos en 6 grupos. (Tabla 3).

Las variantes identificadas se diferenciaron de la cepa pandémica inicial por presentar patrones de restricción diferentes en los DGREA y/o RFLP-PFGE. De las variantes observadas por RFLP-PFGE, 10 contenían un fragmento de DNA adicional de 42 Kb (Fig. 2). Esta tesis se centró en la caracterización del grupo 1 de variantes, por ser el grupo más abundante.

Tabla 3. Variantes en cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

Aislados Variantes	Grupos de Variantes	tdh	trh	Orf8	toxRS/new	PFGE		DGREA
						NotI	ICeu-I	NaeI
PMC 1.6 PMC 5.6 PMC 12.6 PMC 16.6 PMC 17.6 PMA 38.6 PMC 18.6 PMC58.5  PMA 109.5  PMA 110.5	1	+	-	+	+	Fragmento adicional 42 Kb	Fragmento adicional 42 Kb	KX  KX + 3 Fragmentos adicionales KX + 3 Fragmentos adicionales
PMA 43.5	2	+	-	+	+	KX	Fragmento de 100 Kb migra a 140 Kb	KX
ATC 227	3	+	-	+	+	Fragmento adicional de 300 Kb	KX	NR
PMC 48  COC 285	4	+	-	+	+	Fragmento adicional de 70 Kb	KX  KX	KX  NR
NOA 51	5	+	-	+	+	Fragmento de 1078 Kb migra a 935 Kb	KX	KX
PMA 114	6	+	-	+	+	Fragmento de 60 Kb migra a 70 Kb	KX	KX

NR= No Realizado.

KX= corresponde a la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* del sudeste Asiático RIMD2210633.

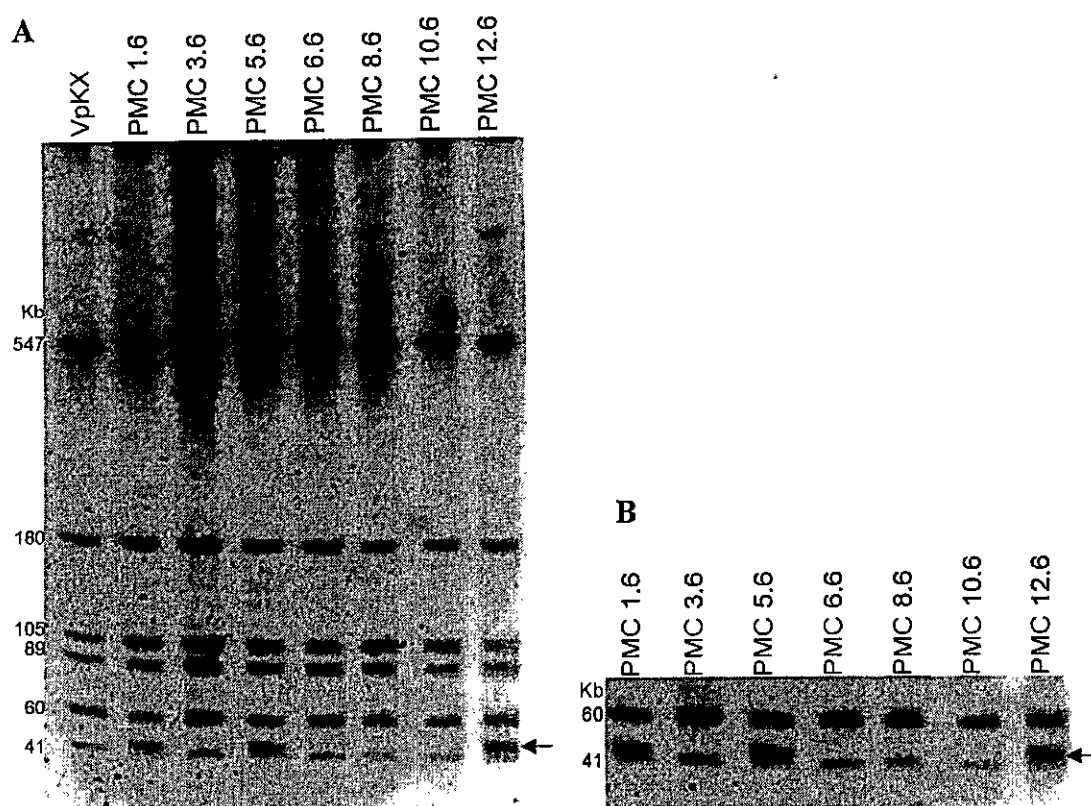


Figura 2. Presencia del fragmento adicional de 42 Kb en aislados variantes de *V. parahaemolyticus*. (A) RFLP-PFGE con ICeu-I de cepas clínicas pandémicas de *V. parahaemolyticus* del 2006. La flecha muestra el fragmento adicional de 42 Kb presente en las cepas PMC1.6, PMC5.6 y PMC12.6. (B) Ampliación de la parte del gel mostrado en A, que contiene el fragmento de DNA de 42 Kb (flecha).

El fragmento de DNA adicional fue detectado también por PFGE del DNA bacteriano sin tratamiento con enzimas de restricción (Fig. 3A). Este resultado indicó que este DNA de 42 Kb no estaba integrado en el cromosoma. Para detectar si el DNA extracromosomal estaba presente en otras cepas pandémicas no analizadas por RFLP-PFGE, se analizaron adicionalmente 125 cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de mariscos y casos clínicos de brotes de diarreas ocurridos en los veranos de

1998, y del 2004 al 2009. Los resultados determinaron la existencia de 4 nuevos aislados que contienen el DNA extracromosomal. En total entonces se encontraron 14 aislados variantes que contienen este DNA de 42 Kb.

El DNA de 42 Kb es recuperable por extracción de DNA con lisis alcalina (Fig. 3B) sugiriendo que consistía en un DNA de doble cadena circular y cerrado, que se comporta similar a un plasmidio.

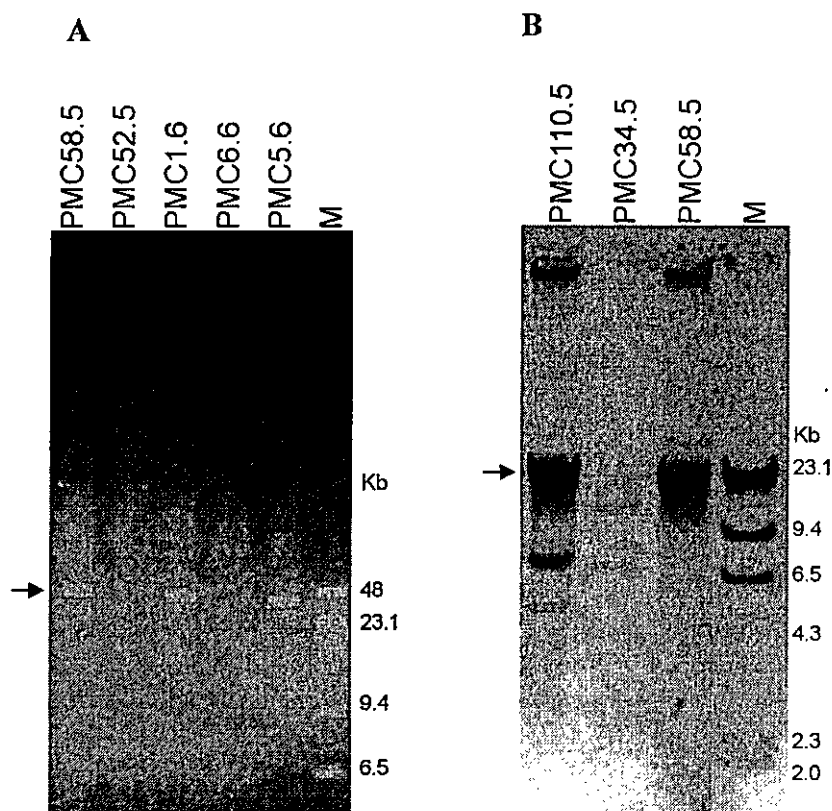


Figura 3. Detección del DNA extracromosomal en cepas de *V. parahaemolyticus* pandémicas. (A) PFGE de DNA bacteriano total no digerido con enzimas de restricción, de las cepas con (PMC58.5, PMC1.6 y PMC5.6) y sin (PMC52.5 y PMC6.6) el DNA extracromosomal. M: Marcador de peso molecular, DNA de  $\lambda$  y DNA  $\lambda$  *Hind*III. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del DNA extraído con lisis alcalina de cepas con (PMA110.5 y PMC58.5) y sin (PMC34) el DNA extracromosomal. M: Marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  *Hind*III. Las flechas indican el DNA extracromosomal.

El plasmidio de 42 Kb fue observado inicialmente en el 23% de aislados pandémicos chilenos en el 2005. Aumentó en el 2006 a 33%, en el 2007 disminuyó a un nivel indetectable y en el 2008 reapareció en el 15% de las cepas analizadas. En el 2009 se observó en el 13% de los aislados pandémicos. Este plasmidio no se observó en los aislados del sudeste Asiático, ni en los aislados de Antofagasta donde se observaron los primeros casos de *V. parahaemolyticus* en Chile, en 1998. Estas nuevas variantes no habían sido antes observadas ni reportadas (Tabla 4).

## **2. Caracterización inicial de las variantes con el DNA extracromosomal de 42 Kb.**

### **2.1. Diversidad del DNA extracromosomal.**

La diversidad del DNA extracromosomal observada en las distintas cepas fue analizada. Se determinó si el DNA extracromosomal encontrado en los 14 aislados variantes correspondían al mismo tipo de DNA. Estos DNAs extracromosomales se extrajeron mediante lisis alcalina y se analizaron mediante RFLP con la enzima de restricción *ApaI*. Los RFLPs del DNA extracromosomal mostraron patrones de restricción idénticos indicando la presencia del mismo tipo de DNA de 42 Kb en los aislados variantes analizados (Fig. 4).

Tabla 4. Presencia del plasmidio de 42 Kb en cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de muestras clínicas y de mariscos.

Origen	No. de Aislados por tipo de muestra				Total por grupo muestra (No. de aislados)		% Positivos por grupo de muestra
	Clínicos		Mariscos		Analizados	Positivos	
	Analizados	Positivos	Analizados	Positivos			
Sudeste Asiático	12	0	0	0	12	0	0
Antofagasta 1998	9	0	4	0	13	0	0
Puerto Montt 2004	9	0	4	0	13	0	0
Puerto Montt 2005	9	1	4	2	13	3	23
Puerto Montt 2006	11	6	10	1	21	7	33
Puerto Montt 2007	27	0	0	0	27	0	0
Puerto Montt 2008	8	2	5	0	13	2	15
Puerto Montt 2009	13	2	0	0	13	2	15



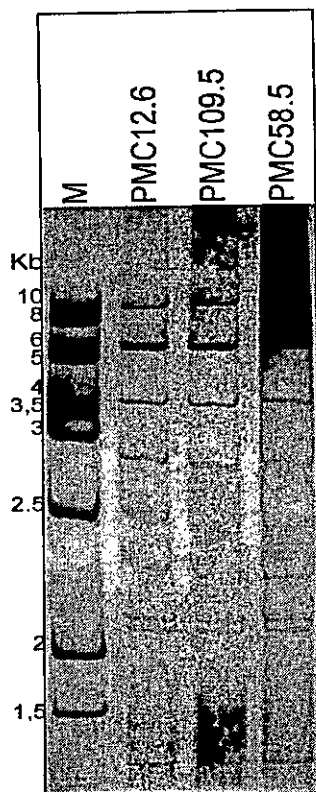


Figura 4. Patrones de restricción del DNA de 42 Kb. RFLP obtenido por digestión con *ApaI* del DNA extracromosomal de 42 Kb, extraído de diferentes aislados. La electroforesis fue realizada en gel de poliacrilamida al 8 % y posteriormente fueron teñidos con nitrato de plata. M: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb.

## 2.2. Determinación de la naturaleza del DNA extracromosomal de 42 Kb.

Para determinar la naturaleza del DNA extracromosomal, se secuenció parte del DNA de 42 Kb. Se seleccionó la cepa PMC58.5 como cepa tipo y el DNA extracromosomal fue obtenido por extracción de DNA con lisis alcalina. La clonación fue realizada con el kit TOPO Shotgun Subcloning (Invitrogen). De los clones obtenidos, se seleccionaron 5 y fueron secuenciados. Los resultados de las secuencias mostraron una identidad de secuencia nucleotídica de 81 a 99% con el genoma del fago VHML de *V. harveyi* (Oakey y col., 2002) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de las secuencias nucleotídicas de ORFs en clones seleccionados con la secuencia de ORFs de VHML.

Clon	ORF en VHML y función putativa	% Identidad <sup>a</sup>
58p10-8b	ORF 37. Transposasa Putativa	291/355 (81%)
58p10-8d	ORF 53. Proteína Putativa	217/236 (92%)
58p10-9f	ORF 10. Proteína de Recombinación Putativa	480/482 (99%)
58p10-11h	ORF 4. DNA primasa Putativa	581/629 (92%)
58p10-12f	ORF 21. Subunidad pequeña Terminasa Putativa	584/602 (97%)
	ORF 22. Subunidad grande Terminasa Putativa	

<sup>a</sup>: Número de residuos idénticos/número de residuos totales (porcentaje de residuos idénticos)

### 2.3. Existencia de genes estructurales y de replicación específicos del fago VHML de *V. harveyi*.

Estos resultados indicaban que el plasmidio de 42 Kb contenía secuencias nucleotídicas similares al fago temperado VHML. Se analizó la existencia de otros genes de VHML en el plasmidio de 42 Kb. Se buscó la existencia de genes estructurales y de replicación que son específicos de VHML mediante amplificaciones por PCR, con partidores diseñados de acuerdo a la secuencia nucleotídica de VHML (Oakey y col., 2002). El resultado mostró la presencia de los 5 genes específicos de VHML analizados, que codifican para la proteína protelomerasa, proteína de la cápside, proteína portal, proteína contráctil de la vaina y proteína del plato-base. La secuenciación de 3 de éstos amplificados mostró una identidad de 93 a 98% con los genes equivalentes VHML (Oakey y col., 2002). En base a los resultados anteriores, de identidades nucleotídicas del 81 a 99% del

plasmidio con el fago VHML, se postuló que el plasmidio correspondía a un fago temperado no integrado al cromosoma bacteriano (Tabla 6).

Tabla 6. Identities de secuencia nucleotídica del plasmidio de 42Kb con el fago temperado VHML de *V. harveyi*.

Amplicon PCR	ORF en VHML y función putativa	% Identidad <sup>a</sup>
Amplicon 1	ORF 1: protelomerasa putativa	508/542 (93%)
Amplicon 2	ORF 24: proteína putativa de cápside	549/559 (98%)
Amplicon 3	ORF 34: proteína putativa de fibra de la cola	283/297 (95%)

<sup>a</sup>: Número de residuos idénticos/número de residuos totales (porcentaje de residuos idénticos)

#### 2.4. Inducción con mitomicina C.

Para confirmar que el plasmidio de 42 Kb correspondería a un fago temperado, se realizó inducción de la lisis con mitomicina C. El tratamiento con mitomicina C a las de cepas que contenían el plasmidio de 42 Kb produjo lisis celular, aproximadamente 60 minutos después de la inducción, mientras que las cepas que no contienen el plasmidio continuaron su crecimiento de manera normal (Fig. 5). El sobrenadante obtenido luego de la lisis fue concentrado por ultracentrifugación y observado al microscopio electrónico. En la microscopia electrónica se observan partículas virales que corresponden a un myovirus. Estas partículas tienen una cápside icosaédrica de 60 nm de ancho, una cola contráctil de 160 nm largo por 6 nm de ancho, envuelta por una vaina de 15 nm ancho (Fig. 6).

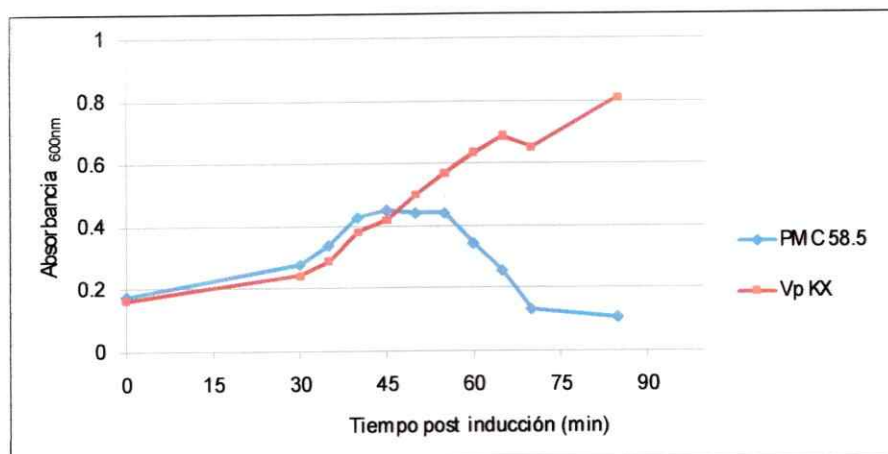


Figura 5. Inducción con mitomicina C de cepas con y sin el plasmidio de 42 Kb. Las cepas PMC58.5 (con el plasmidio) y *V. parahemolyticus* KX (sin el plasmidio) fueron crecidas en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2, seguidamente los cultivos fueron tratados con 30 ng/ml de mitomicina C y se continuó la incubación. Cepas con el plasmidio de 42 Kb PMC58.5 (línea azul) y *V. parahemolyticus* KX (línea roja).

La cantidad de DNA de 42 Kb recuperado desde las partículas virales del lisado inducido, corresponde aproximadamente a 200 fagos por célula, 20 a 100 veces la cantidad de DNA del plasmidio obtenido después de la extracción alcalina en células no inducidas. La partícula viral tiene un DNA de 42 Kb de igual tamaño al del plasmidio de acuerdo a su migración electroforética en gel de agarosa (Fig. 7).

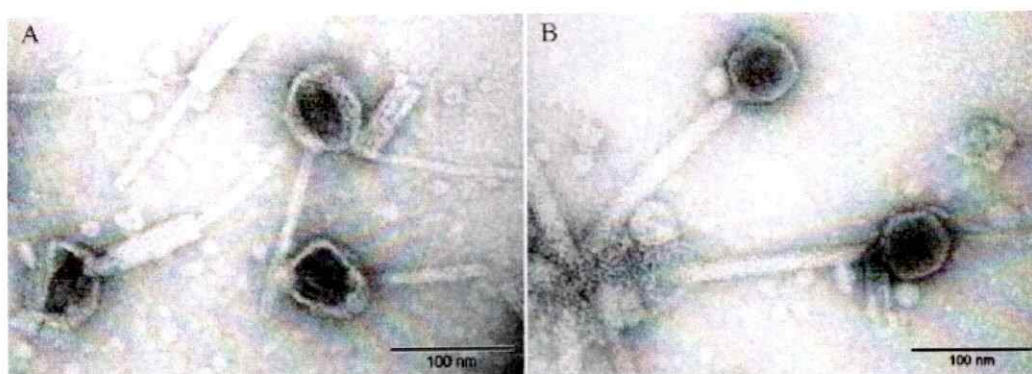


Figura 6. Partículas virales observadas por tinción negativa después de la inducción con mitomicina C de la cepa tipo PMC58.5 de *V. parahaemolyticus*. El sobrenadante obtenido en la inducción fue concentrado por ultracentrifugación. (A) Partículas virales con la cola contraída. (B) Partículas virales con la cola no contraída.

Sin embargo, a pesar de estas similitudes, el DNA del fago no pudo ser recuperado con extracción alcalina, indicándonos la existencia de una conformación diferente entre el DNA fago y del plasmidio. Las observaciones anteriores de secuencias con identidad nucleotídica de 81 a 99% con el fago VHML, la obtención de partículas virales por la inducción con mitomicina C y la existencia del gen putativo de la protelomerasa, indicaron que el plasmidio de 42 Kb corresponde a un fago temperado inducible que fue denominado VP58.5.

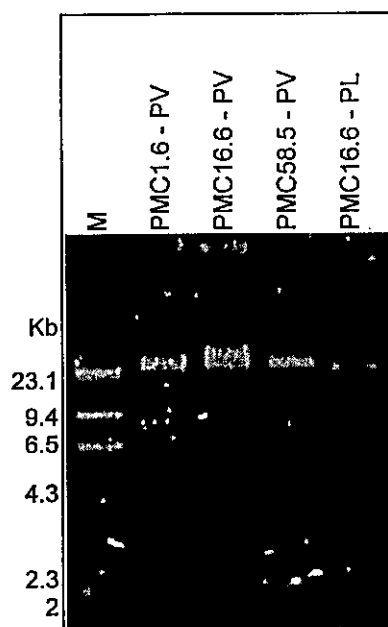


Figura 7. DNA extraído desde la partícula viral y del plasmidio de diferentes variantes. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, del DNA extraído desde la partícula viral (PMC1.6-PV, PMC16.6-PV y PMC58.5-PV), mediante tratamiento con SDS, proteinasa K y fenol-cloroformo. DNA del plasmidio extraído con lisis alcalina desde PMC16.6-PL. PV: indica partícula viral; PL: indica plasmidio. M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  HindIII.

### **3. Caracterización detallada del fago VP58.5.**

La presencia del gen putativo de la Protelomerasa (Rybchin y Svarchevsky, 1999), observada en las amplificaciones por PCR, sugirió que el profago podía consistir en un DNA lineal con los extremos covalentemente cerrados en lugar de un DNA circular y cerrado, como se asumió en un principio, debido a la recuperación del plasmidio por extracción con lisis alcalina. Los plasmidios lineales con extremos covalentemente cerrados han sido observados en los profagos del grupo de fagos teloméricos (Casjens y col., 2004; Hertwig y col., 2003a; Rybchin y Svarchevsky, 1999). La caracterización en detalle de VP58.5 se centró en determinar si este nuevo fago pertenece al grupo de fagos teloméricos. Para esta caracterización se analizó la existencia de permutación circular entre los DNAs del fago y profago, los extremos de ambos DNAs y la determinación de la secuencia nucleotídica completa del fago y profago.

#### **3.1. Determinación de la permutación circular entre los DNAs del fago y profago VP58.5.**

Los RFLPs de los DNAs del profago y el fago con la enzima *Bgl*III muestran patrones de restricción similares, pero el profago tiene fragmentos de DNA que no están presentes en el fago y viceversa (Fig. 8A). Probablemente estas diferencias sean debidas a la permutación circular entre las 2 moléculas, como ocurre en los fagos teloméricos (Casjens y col., 2004; Hertwig y col., 2003a; Rybchin y Svarchevsky, 1999). Para determinar la permutación circular se realizó el mapa de restricción de ambos DNAs con las enzimas de restricción *Nhe*I, *Hind*III y *Sph*I. El

resultado mostró que los mapas de los DNAs corresponden a moléculas lineales con permutación circular, entre los DNAs del fago y profago (Fig. 8B). La figura 8C muestra el esquema deducido si ambos DNAs son generados desde una molécula circular común por un solo corte en las posiciones indicadas, generado por la enzima protelomerasa, similar a como ocurre en los fagos teloméricos. La permutación circular observada entre los DNAs del profago y fago VP58.5 es de aproximadamente el 35% del genoma.

### **3.2. Caracterización de los extremos covalentemente unidos del DNA del profago.**

La unión covalente de los extremos de las hebras complementarias del DNA del profago se determinó por análisis de restricción con la enzima *Bgl*III. Los fragmentos digeridos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, en condiciones no desnaturalantes y con desnaturalación alcalina (McDonell y col., 1977). La enzima *Bgl*III corta el DNA del profago en 4 fragmentos (Fig. 9A). En condiciones desnaturalantes los fragmentos de doble hebra de 9,1 y 2 Kb aparecen con 18,2 y 4 Kb, el doble del largo al tamaño esperado (Fig. 9B). Los fragmentos restantes conservan la misma longitud observada en condiciones no desnaturalantes. Las observaciones indicadas en los patrones de migración se deben a la presencia de fragmentos que tienen una horquilla o hairpin ubicada en un extremo debido a la unión covalente de los extremos de sus hebras complementarias. Estos fragmentos en condiciones alcalinas se desnaturalizan, pero mantienen unidas las 2 hebras complementarias, formando así los nuevos fragmentos con el doble de la longitud (Fig. 9C).

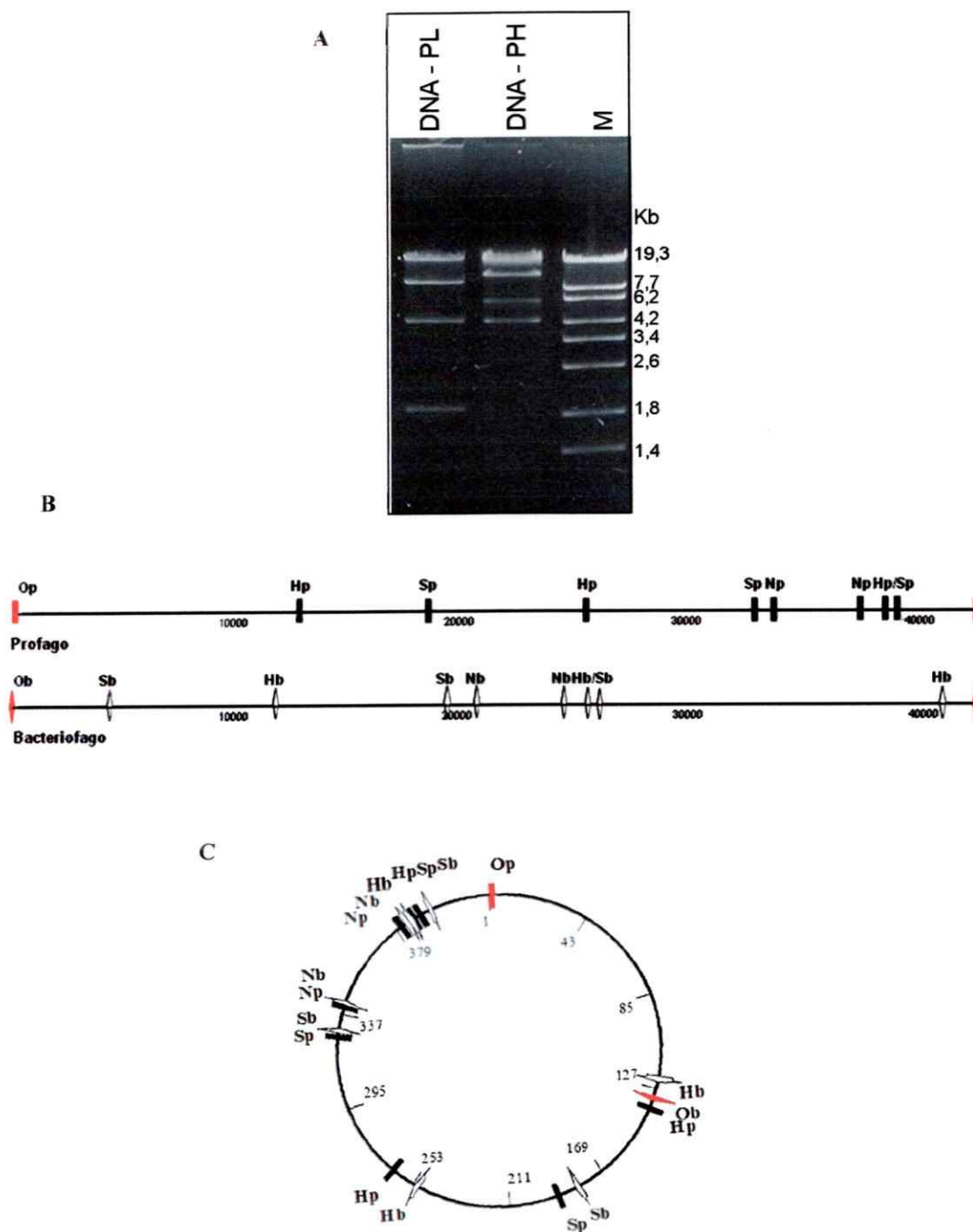


Figura 8. Permutación circular entre fago y profago de VP58.5. (A) RFLP con la enzima *Bgl*III de los DNAs del fago (PH) y profago (PL), M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  *Eco*130I. (B) Mapa de restricción de los DNAs del fago y profago. N, H y S corresponden a sitios de corte por las enzimas de restricción *Nhe*I, *Hind*III y *Sph*I. (C) Mapa circular de la permutación circular del fago VP58.5. Las líneas rojas muestran los posibles extremos, los sitios de restricción son mostrados con líneas negras para el plasmidio y flechas blancas para el fago, y los números indican la posición de los sitios de cortes realizados por las enzimas de restricción.



Estos resultados indicarían que el profago VP58.5 tiene los extremos covalentemente unidos, similar a lo observado en los fagos teloméricos.

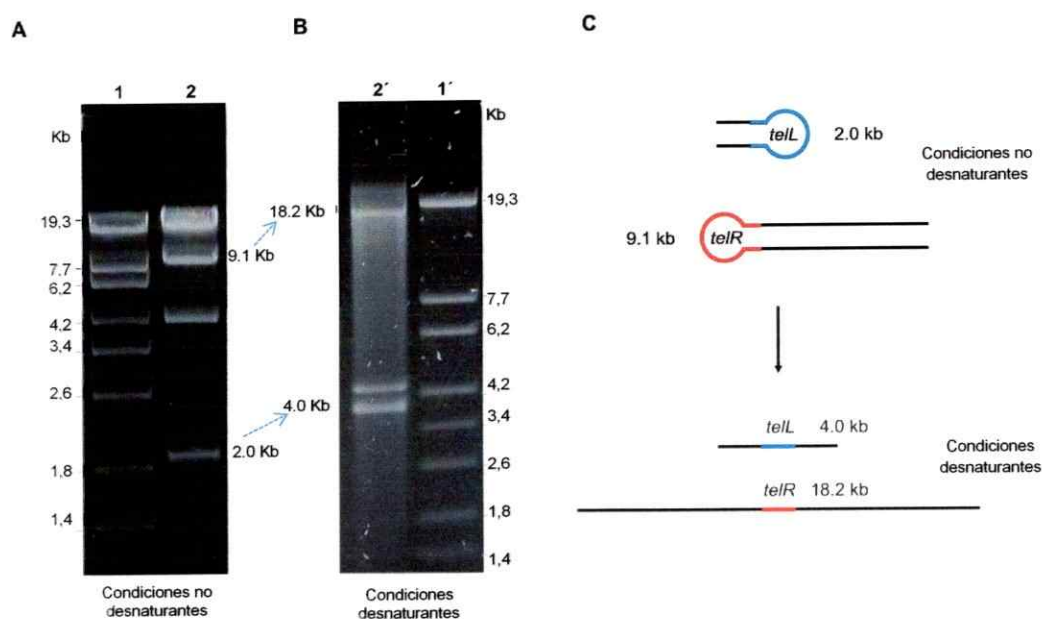


Figura 9. Determinación de los extremos covalentemente unidos del DNA del profago VP58.5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % del DNA del profago digerido con *Bgl*III y resuelto en condiciones no desnaturalantes (A) y en condiciones desnaturalantes (B). Carril 1, marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  *Eco*130I; carril 2, DNA del profago digerido con *Bgl*III; carril 1' y 2', los mismos DNAs que la figura A, pero resueltos en condiciones desnaturalantes. (C) Representación esquemática de la estructura de los fragmentos en los extremos del profago en condiciones desnaturalantes y no desnaturalantes.

### 3.3. Determinación de los extremos cohesivos del DNA del fago.

La identificación de los extremos del DNA del fago se realizó mediante la digestión del DNA del fago con la enzima de restricción *Van*9II. Los fragmentos fueron resueltos en geles de agarosa. El resultado mostró la existencia de 2

fragmentos de restricción de 4,8 y 3,2 Kb que tienen menor intensidad que los demás fragmentos (Fig. 10A, carril 1). Estos fragmentos de 4,8 y 3,2 Kb adquieren la misma intensidad de los demás fragmentos después de calentarlos a 60°C por 5 minutos y enfriarlos rápidamente (Fig. 10A, carril 2). El tratamiento con DNA ligasa antes la digestión genera un nuevo fragmento de 8 Kb, mientras que los otros 2 fragmentos no se observan (Fig. 10A, carril 4). El fragmento de 8 Kb no desaparece al calentar a 60°C por 5 minutos (Fig. 10A, carril 5). Estos resultados indican que los fragmentos de restricción con *Van9II* de 4,8 y 3,2 Kb están localizados en los extremos del fago y que contienen extremos cohesivos. Estos 2 fragmentos contendrían los extremos cohesivos *cosA* de (4,8 Kb) y *cosB* (3,2 Kb), de acuerdo a lo observado en otros fagos teloméricos (Rybchin y Svarchevsky, 1999). La ligación de estos fragmentos origina el nuevo fragmento denominado *cosAB* de 8 Kb.

La confirmación de los extremos cohesivos se obtuvo mediante secuenciación de los extremos del fago. En esta etapa del desarrollo de la tesis se disponía de gran parte del genoma del fago VP58.5 secuenciado. Con estas secuencias se diseñaron los partidores (*cos-F* y *cos-R*) que flaqueaban los extremos pronosticados del DNA del fago. La secuenciación (adición de nucleótidos) de ambas hebras complementarias del DNA del fago se detuvo abruptamente en la misma posición (Fig 10B). Mientras que el DNA de fago tratado con DNA ligasa pudo ser secuenciado sin detención de la síntesis (Fig. 10C). El alineamiento de las 2 secuencias obtenidas reveló el solapamiento de 11 nucleótidos. Estos resultados indicaron que el genoma del fago posee 11 nucleótidos que sobresalen en el extremo 5' formando así los extremos cohesivos.

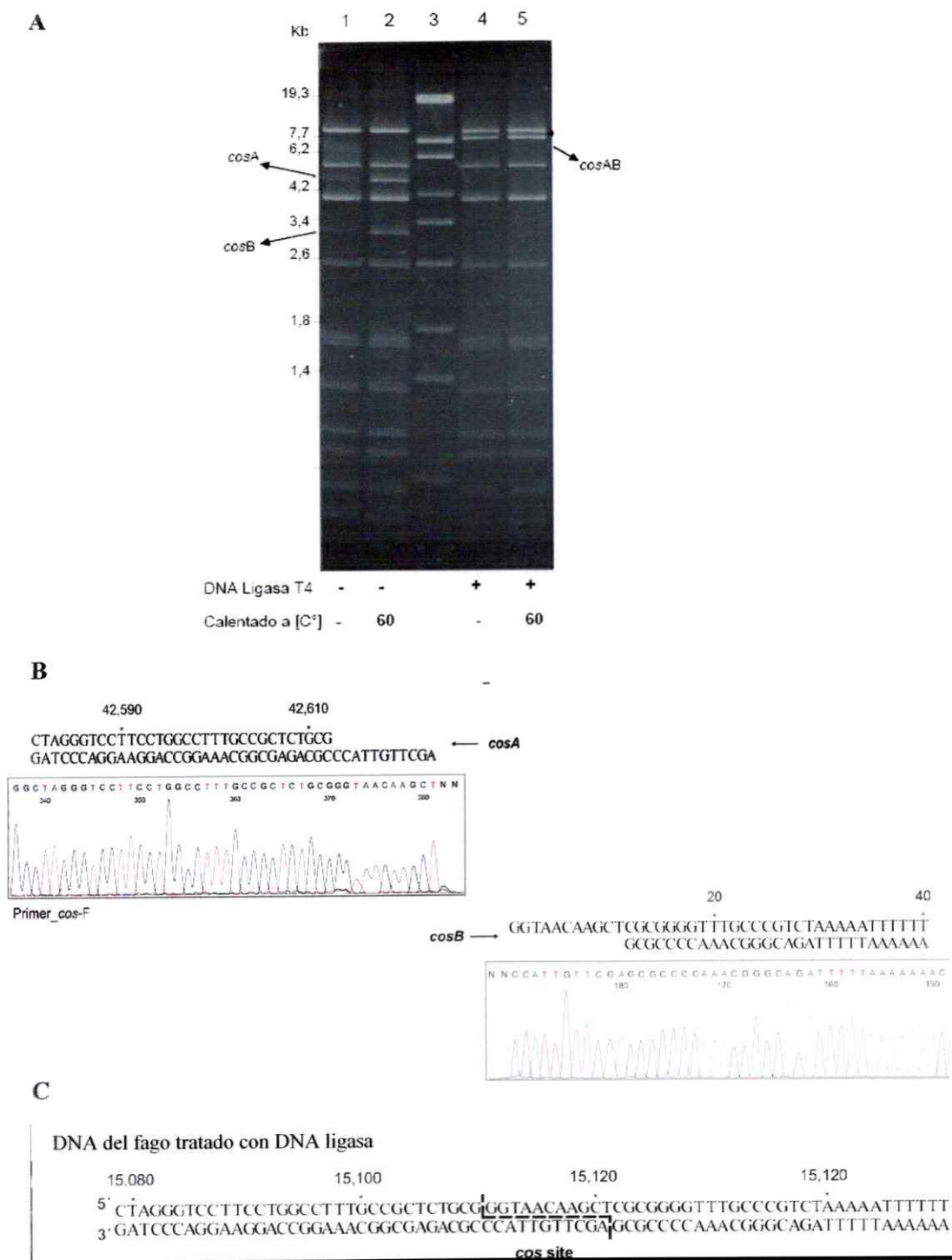


Figura 10. Determinación de los extremos cohesivos del DNA del fago. (A) RFLP con *Van9II* del DNA del fago. Carril 1, patrón de restricción de DNA del fago no tratado; carril 2, el mismo DNA que en el carril 1, pero calentado por 5 minutos a 60°C; carril 3, marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  *Eco130I*; carril 4 y 5, DNA del fago sin calentar y calentados que fueron tratados con DNA ligasa antes de la digestión. (B) Electroferogramas de los extremos *cosA* y *cosB*. (C) Secuencia del sitio *cos* después del tratamiento con DNA ligasa. Los nucleótidos que sobrelapan están marcados.

### 3.4. Determinación de la secuencia nucleotídica del fago VP58.5.

Utilizando la identidad de secuencia nucleotídica de 81 a 99% del DNA del fago VP58.5 con VHML, se diseñaron aproximadamente 135 partidores en base a la secuencia genómica de VHML (Anexo 1) (Oakey y col., 2002). Los partidores diseñados se usaron para el secuenciamiento directo usando tanto el DNA del profago y del fago como templado. La secuencia del fago VP58.5 tiene 42.612 nucleótidos y un contenido G + C de 50.9%. El promedio de identidad de secuencia aminoacídica con el fago VHML es de 92%. Se identificaron 58 ORFs mediante el programa ORF finder (NCBI). De los ORFs identificados, 44 ORFs tienen una identidad aminoacídica del 91% al 100% con VHML (Oakey y col., 2002). Nueve ORFs tienen una identidad aminoacídica entre 38 y 86% con VHML. 2 ORFs presentan una identidad aminoacídica de 74 a 83% con plasmidios aislados recientemente de *V. parahaemolyticus* (*Vibrio* sp. 0908) (Hazen y col., 2007). Seis ORFs fueron asignados a proteínas no relacionadas con fagos, que codifican para una proteína hipotética Shewmr7\_0744 de *Shewanella* spp. MR-7, la proteína hipotética C0967 de *E. coli* CFT073, la proteína hipotética Sbal195\_2898 de *Shewanella baltica* OS195, un operon regulador *tcdA-E* de *Bacillus cereus* ATCC 14579, para la subunidad reguladora del proteasoma de *Pseudoalteromonas tunicata* D2 y para la proteína hipotética Pput\_4147 *Pseudomonas putida* F1. 4 ORFs tienen una identidad aminoacídica de 49 a 82% con el fago VP882 aislado de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* (Lan y col., 2009). Mientras que 3 ORFs fueron no identificados (Ver Anexo 2). A pesar del 92% promedio de identidad de secuencia aminoacídica entre los fagos VP58.5 y VHML, los genomas difieren con respecto al orden génico. El genoma de VHML se inicia con el gen de la protelomerasa (Oakey

y col., 2002), mientras que en VP58.5 este gen está ubicado al centro del genoma y los dos primeros ORFs codifican para las subunidades de las terminasas (Fig. 11).

La organización genómica de VP58.5 es similar a la organización de los fagos teloméricos (Casjens y col., 2004; Hertwig y col., 2003b; Ravin y col., 2000). El genoma del fago puede ser dividido en 2 brazos: brazo izquierdo y derecho (Ravin y col., 2000). El brazo izquierdo del genoma del fago VP58.5 consiste principalmente en genes que codifican para proteínas estructurales de la cola (ORFs 11, 13, 14, 15, 22-28), la cabeza (ORFs 4 y 5) y proteínas de ensamblaje del fago (ORFs 1 y 2). Además de las proteínas estructurales, está presente el ORF 38, el cual codifica para la proteína de partición, ParA. El brazo derecho de VP58.5 contiene los genes encargados de la replicación y de la inmunidad. El ORF40 codifica para la proteína protelomerasa (Tel), encargada del procesamiento del DNA del fago en una secuencia repetida invertida, dando origen al plasmidio lineal con los extremos covalentemente unidos (Ravin y col., 2003). El gen de la protelomerasa de VP58.5 es similar a los genes de protelomerasa encontrados en los fagos teloméricos; tiene 92% de identidad aminoacídica con la protelomerasa de VHML (Oakey y col., 2002), 28% a 24% con las de los fagos VP882 (Lan y col., 2009),  $\phi$ HAP-1 (Mobberley y col., 2008),  $\phi$ KO2 (Casjens y col., 2004), N15 (Ravin y col., 2000) y PY54 (Hertwig y col., 2003b) (Anexo 2).

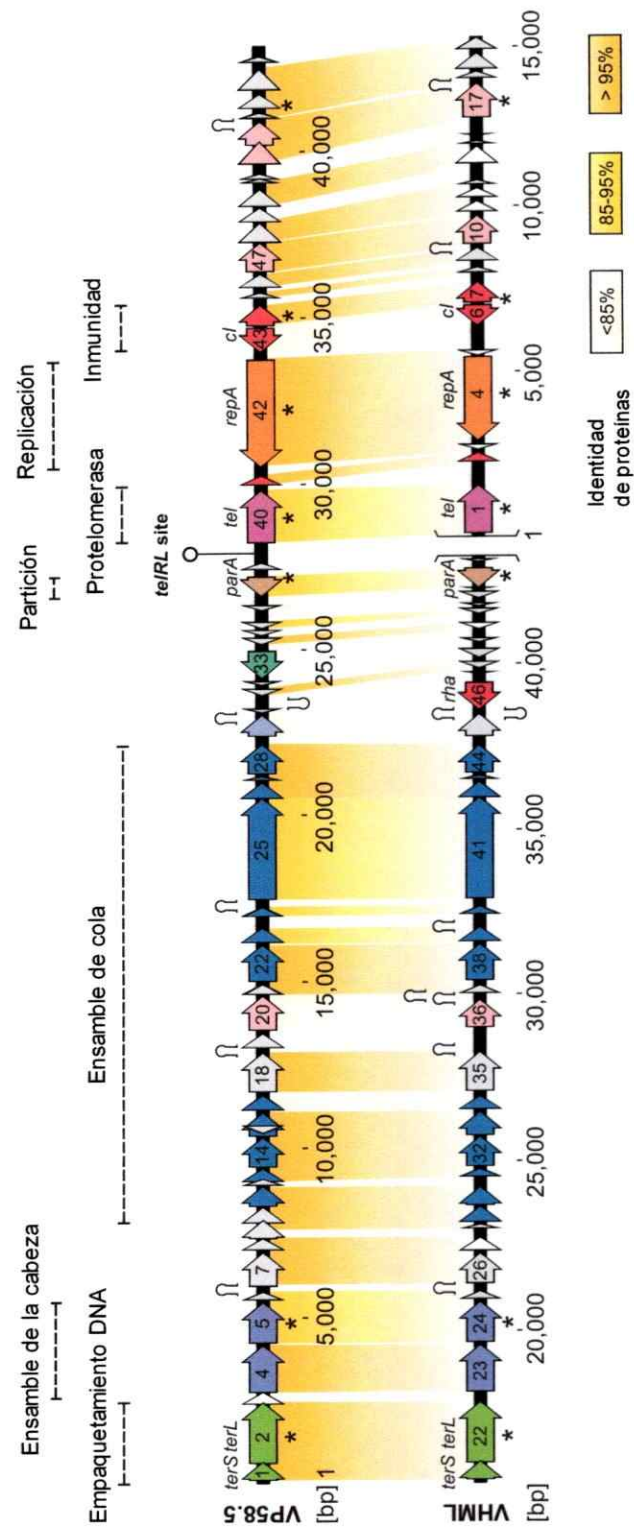


Figura 11. Organización genómica de los fagos VP58.5 y VHML. Para la comparación de los genomas de los fagos, el DNA de VHML está representado en el mismo orden como VP58.5, iniciando con los genes de las terminasas. Los extremos de VHML están indicados por paréntesis. Los colores indican la función predicha de los productos génicos como se indican: verde claro, empaquetamiento de DNA; violeta, ensamble de la cabeza; azul, ensamble de la cola; café, partición y estabilidad del plasmidio; lila, protelomerasa; rosa, producto con otras funciones; gris, proteína putativa; blanco, desconocido; verde oscuro, lisis; naranja, replicación; rojo, represor. Los genes relacionados están conectados por las barras de color. El carácter  $\Omega$ , indica terminadores de la transcripción independientes de Rho.

El ORF 42 codifica para una proteína de replicación, RepA, tiene 96% de identidad aminoacídica con la RepA de VHML (Oakey y col., 2002). RepA es una proteína de replicación con actividades de primasa y helicasa (Ravin y col., 2003), que ha sido encontrada también en los fagos teloméricos N15, PY54,  $\phi$ KO2, VP882 y  $\phi$ HAP-1. Contiguo a RepA están los ORFs 43 y 44, que codifican para los genes de inmunidad. El ORF 43 codifica para un represor putativo de fagos con 82% de identidad aminoacídica con VHML, mientras que el ORF 44 codifica para un represor tipo Cro (Hertwig y col., 2003b), con 100% de identidad aminoacídica con VHML. Los productos de los ORFs 53 y 54 están relacionados a las subunidades de adenin-metiltransferasa de VHML (identidad aminoacídica de 98 y 100%, respectivamente) (Oakey y col., 2002). Existen además muchos productos génicos en VP58.5 que tienen función desconocida, pero probablemente corresponden a proteínas similares a las encontradas en VHML.

Los brazos derecho e izquierdo en los que se divide el genoma de VP58.5 están separados por una secuencia palindrómica. Esta secuencia está ubicada entre el gen de partición y la protelomerasa (Rybchin y Svarchevsky, 1999). La secuencia palindrómica es comparable al sitio de resolución del telómero (*telRL site*) observado en los fagos teloméricos N15, PY54 y  $\phi$ KO2. El sitio de resolución del telómero es la secuencia blanco para que la protelomerasa corte y genere los extremos covalentemente unidos del profago (Deneke y col., 2000; Hertwig y col., 2003a). El genoma de VP58.5 tiene una secuencia palindrómica de 88 bp y está flanqueado por repetidos invertidos (Fig. 12A). La comparación de las secuencias palindrómicas entre VP58.5 y VHML reveló que 24 pb ubicadas en la parte central no están presentes en la secuencia publicada de VHML (Fig. 12B). Las diferencias

observadas entre los *te*/RL, probablemente expliquen los distintos extremos observados en los fagos VP58.5 (extremos cohesivos) y en VHML (repetidos invertidos). El procesamiento de este palíndromo también podría explicar los distintos estados del profago en las bacterias, como plasmidio con los extremos covalentemente unidos en VP58.5 o integrado al cromosoma bacteriano como se ha reportado en VHML.

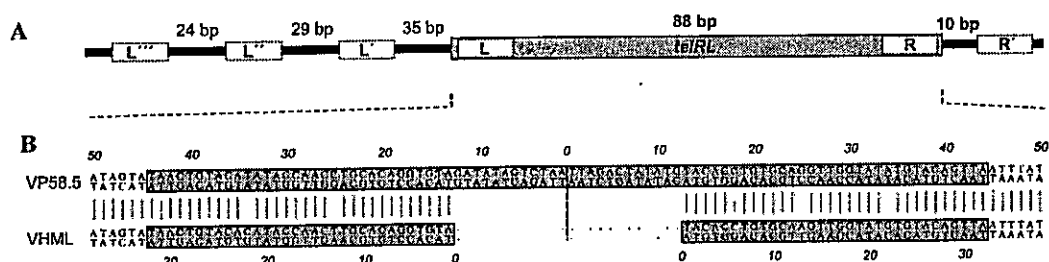


Figura 12. Diagrama de la región *te*/RL del fago VP58.5. (A) Esquema del sitio *te*/RL, donde se muestra la secuencia palindrómica de 88 pb (*te*/RL), flanqueada por repetidos invertidos (L, izquierdo; R, derecho). (B) Comparación del palíndromo de VP58.5 con VHML. La secuencia central de 24 pb está ausente en la secuencia VHML.

### 3.5. Composición de proteínas del fago VP58.5.

El perfil de proteínas del fago VP58.5 purificado fue determinado con el objeto de analizar las proteínas estructurales más abundantes presentes en el virión VP58.5. Para la purificación, las partículas virales fueron concentradas mediante un gradiente de densidad de CsCl. En el gradiente se obtuvieron 3 bandas que fueron recolectadas. Las bandas se analizaron para determinar la densidad, el tamaño del



DNA y el perfil de proteínas estructurales. Las densidades obtenidas fueron de B1= 1,22 g/ml, B2= 1,27 g/ml y B3= 1,41 g/ml. La banda B1, corresponde a las partículas virales con la cola contraída (Fig. 6A), y las partículas virales de la banda B3 corresponden a partículas sin contraer la cola (Fig. 6B). El contenido de DNA de las bandas B1 y B3 fue analizado en geles de agarosa al 0,8%. La banda B3 contiene aproximadamente 10 veces la cantidad de DNA presente en la banda B1 (Fig. 13A). Las proteínas estructurales fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE para los tres tipos de partículas virales en las bandas B1, B2 y B3 (Fig. 13B). El perfil proteico de la banda B3 está compuesto por al menos 12 proteínas, de las cuales 5 (6, 7, 8, 10 y 11) aparecen como intensas bandas en los geles de SDS (Fig. 13C). Las 12 bandas fueron escindidas del gel y analizadas por espectrometría de masa. Seis proteínas (3, 5, 6, 8, 11 y 12) pudieron ser asignadas como productos génicos de VP58.5 (Fig. 13C). La proteína 3 (proteína portal putativa), la proteína 6 (proteína del tubo de la cola putativa) y la proteína 11 (proteína de la cola putativa) son codificadas por los ORFs 4, 22 y 24. Las proteínas 5 y 12, correspondientes a los productos de los ORFs 18 y 17, no pudieron identificarse con alguna proteína de función conocida. La banda de más intensidad corresponde a la proteína 8, producto del ORF 7, podría representar la proteína mayor de la cápside debido a su abundancia (Mobberley y col., 2008).

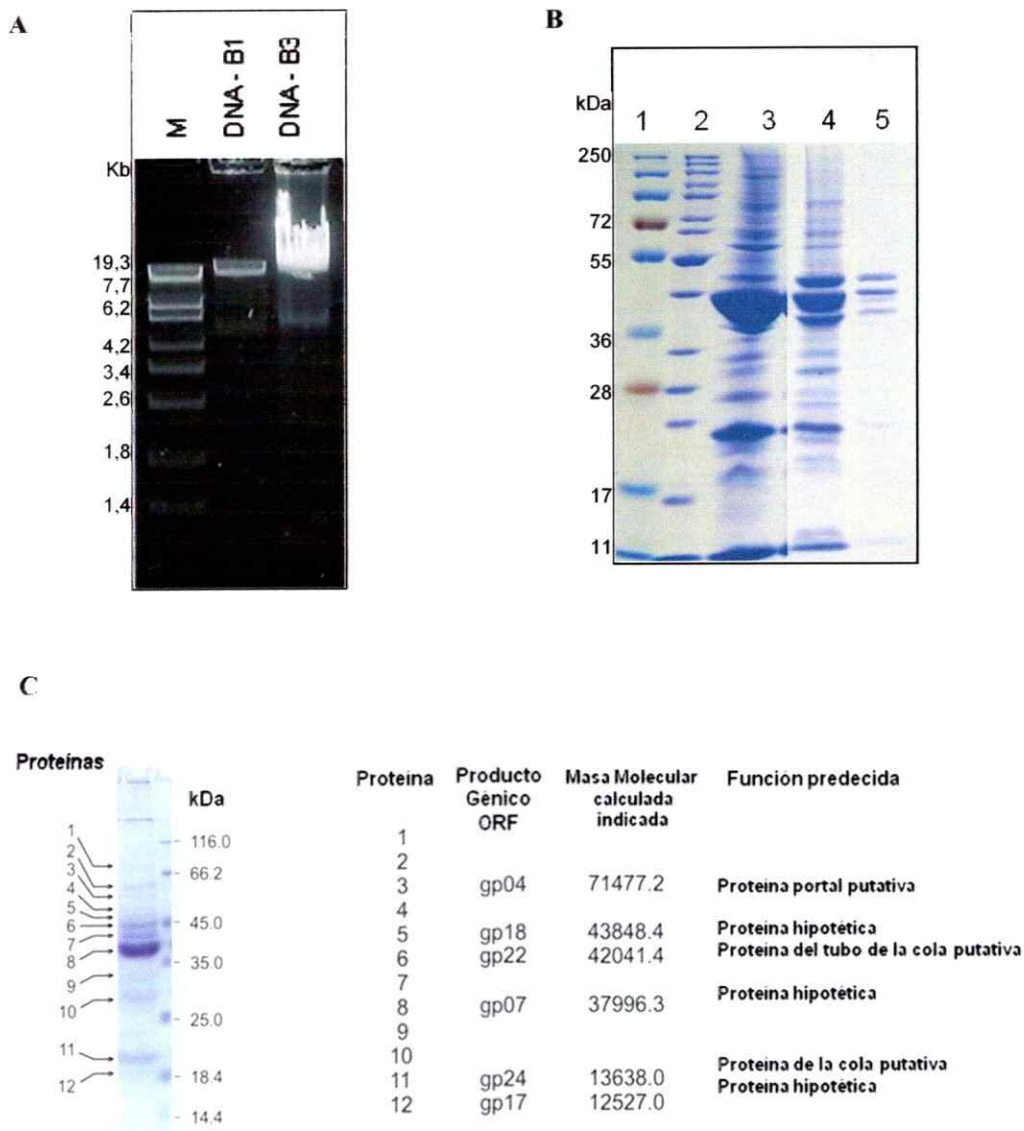


Figura 13. Composición de proteínas del fago VP58.5. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, del contenido de DNA de las bandas B1 y B3 del fago VP58.5. M: marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  Eco130I. (B) Gel de SDS-PAGE al 12% del perfil de proteínas de VP58.5. Carril 1, marcador de peso molecular prestained protein ladder Fermentas; carril 2, marcador de peso molecular unstained protein ladder Fermentas; carril 3, 4 y 5 perfil protéico de las bandas B1, B2 y B3). (C) Electroforesis en gel de SDS-PAGE del perfil de proteínas de la banda B3, asignamiento de las bandas de proteínas a productos genéticos y función predecida.

#### 4. Efecto de la presencia del fago VP58.5 en el crecimiento de *V. parahaemolyticus*.

##### 4.1. Inducción de VP58.5 con luz ultravioleta

Se probó el efecto de la presencia del fago VP58.5 en el crecimiento de *V. parahaemolyticus* considerando que la irradiación con luz ultravioleta (UV) puede inducir la replicación del profago y la lisis bacteriana. Se observó que al igual que la mitomicina C, la irradiación con luz UV de la cepa PMC58.5 (cepa que contiene el profago VP58.5) induce la lisis bacteriana con producción de partículas virales, mientras que en la cepa PMA37.5 (cepa pandémica sin el profago VP58.5) no se observó lisis bacteriana. La lisis fue observada por disminución de la  $DO_{600nm}$  y se detectó 1 hora después de la irradiación con luz UV (Fig. 14).

La hambruna produjo resultados de inducción similares a los obtenidos con mitomicina C y la luz UV. La inducción en hambruna se realizó en agua de mar sintética (AMS). El cultivo de PMC58.5 en AMS produjo partículas virales con un título de  $10^7$  UFP/ml, sin embargo no se produjo lisis del cultivo bacteriano, y el título de fagos infectivos observado fue menor al obtenido en la inducción con mitomicina C.

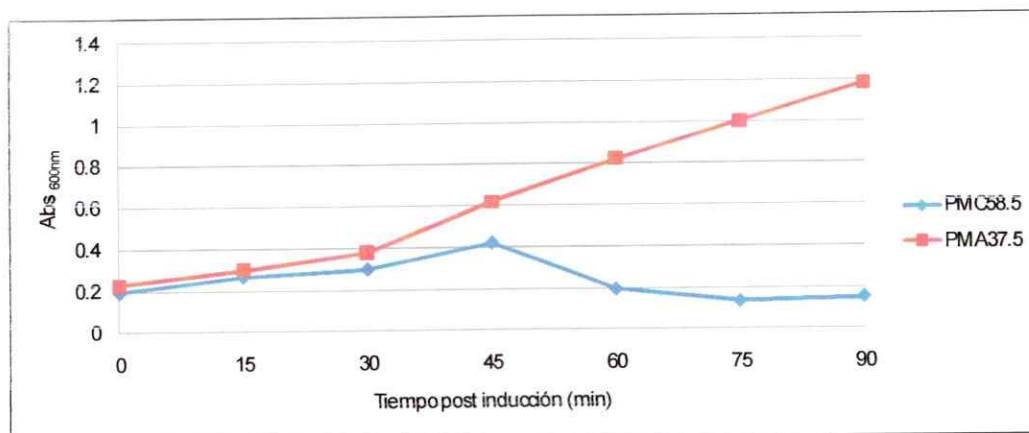
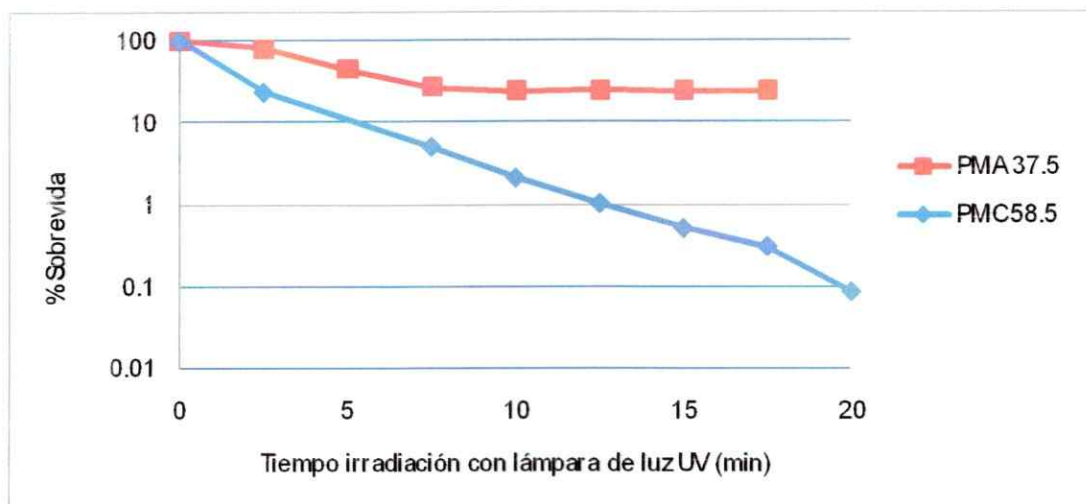


Figura 14. Inducción con luz UV del profago VP58.5. Las cepas PMC58.5 y PMA37.5 (con y sin el profago) fueron crecidas a 37°C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. Los cultivos fueron irradiados con una lámpara de 6W y longitud de onda de 310 nm, por 12,5 minutos. Después de la irradiación los cultivos fueron incubados a 37°C nuevamente en agitación. El crecimiento o la lisis celular fue evidenciada midiendo la  $DO_{600nm}$ .

#### 4.2. Determinación del aumento de la sensibilidad a la luz UV por la presencia del profago.

En base a los resultados anteriores, se exploró la posibilidad que la presencia del profago inducible pueda incrementar la sensibilidad de la cepa pandémica a la radiación UV y a la irradiación solar. Las curvas de sobrevivencia de las cepas PMC58.5 y PMA37.5, obtenidas después de irradiar con luz UV o con exposición solar, mostraron una tasa de muerte específica de 7 a 15 veces más alta en las bacterias que contienen el profago. La figura 15A muestra el resultado de un solo experimento, del efecto de la irradiación con luz UV, aunque se realizaron varios experimentos en cada caso. El promedio de muerte específica obtenido a partir de 4 experimentos fue de  $-0.175 \pm 0.029 \text{ min}^{-1}$  y  $0.027 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  para PMC58.5 y PMA37.5, respectivamente.

A



B

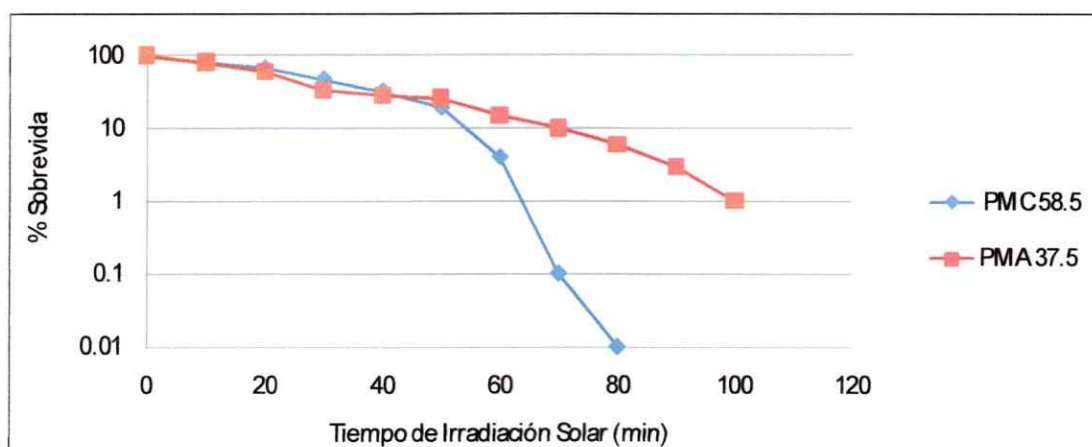


Figura 15. Efecto de la irradiación con lámpara de luz UV (A) y solar (B) en la sobrevida de las cepas PMC58.5 y PMA37.5. (A) Las cepas PMC58.5 y PMA37.5 (con y sin el profago) fueron crecidas a 37°C en agitación hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. Los cultivos se irradiaron con una lámpara de 6W y longitud de onda de 310 nm, por 12,5 minutos. Durante la irradiación se tomaron alícuotas de cada cultivo y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinado por siembra en profundidad en medio LB con 3% de NaCl y 1.5% de agar. PMC58.5 (línea azul) y PMA37.5 (línea roja). (B) Las cepas PMC58.5 (con el profago VP58.5) y PMA37.5 (sin el profago), fueron crecidas hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. Los cultivos fueron expuestos al sol de medio día en un ambiente abierto por 2 horas. Se tomaron alícuotas del cultivo irradiado y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue determinada por la siembra en profundidad de una alícuota del cultivo irradiado en medio LB con 3% de NaCl y 1.5% de agar.

La medición de tasas de muerte específica medidas bajo irradiación solar en diferentes experimentos (Fig. 15B) no pudieron ser comparadas directamente, debido a la inhabilidad para reproducir las condiciones de irradiación solar. Sin embargo, en cada experimento cuando la sobrevivencia de la cepa PMA37.5 fue de 10%, la sobrevivencia de PMC58.5 fue entre 0,2% y 1%.

La sensibilidad aumentada en la cepa PMC58.5 a la luz UV fue revertida al curar las cepas del plasmidio, indicando que ésta se debe a la presencia del fago temperado. La curación del plasmidio se realizó por tratamiento con naranja de acridina (acridin orange, AO) o por irradiación con luz UV. La confirmación de la curación en cepas sobrevivientes al tratamiento, se confirmó por la ausencia en las células curadas de los ORF1, ORF24 y ORF34 del fago, determinada por PCR. La cepa PMC58.5 curada por incubación con naranja de acridina disminuyó la tasa de muerte a  $0.019 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$ . Igualmente la cepa PMC58.5 curada espontáneamente después de la irradiación con luz UV, mostró una baja sensibilidad con una tasa de muerte de  $0.014 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ . Estas cepas curadas tienen una sensibilidad similar a la cepa PMA37.5 que no contiene el profago (Fig. 16).

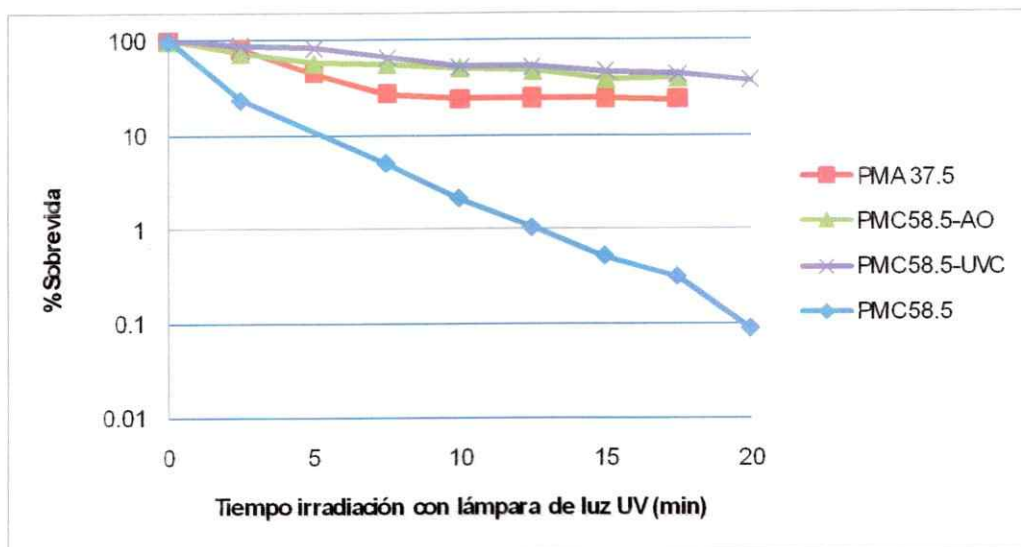


Figura 16. Curva de sobrevida después de irradiación UV en cepas curadas y no curadas. Efecto de la radiación con lámpara de luz UV en la sobrevida de las cepas PMC58.5, PMA37.5, PMC58.5 curada con naranja de acridina (PMC58.5-AO) y PMC58.5 curada espontáneamente después de la irradiación UV (PMC58.5-UVC). Las cepas PMC58.5, PMA37.5, PMC58.5-AO y PMC58.5-UVC fueron crecidas a 37°C hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,2. Los cultivos se irradiaron con una lámpara de 6W y longitud de onda de 310 nm, por 12,5 minutos. Se tomaron alícuotas de cada cultivo durante la irradiación y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó por la siembra en profundidad en medio LB con 3% de NaCl y 1.5% de agar.

Las cepas PMC58.5-UVC y PMC58.5-AO (cepas curadas después de la irradiación con UV y con naranja de acridina respectivamente), junto con recuperar la sensibilidad a la luz UV de las cepas no lisogenizadas, se hacen sensibles a la infección por el fago VP58.5, formando placas de lisis (Fig. 17).

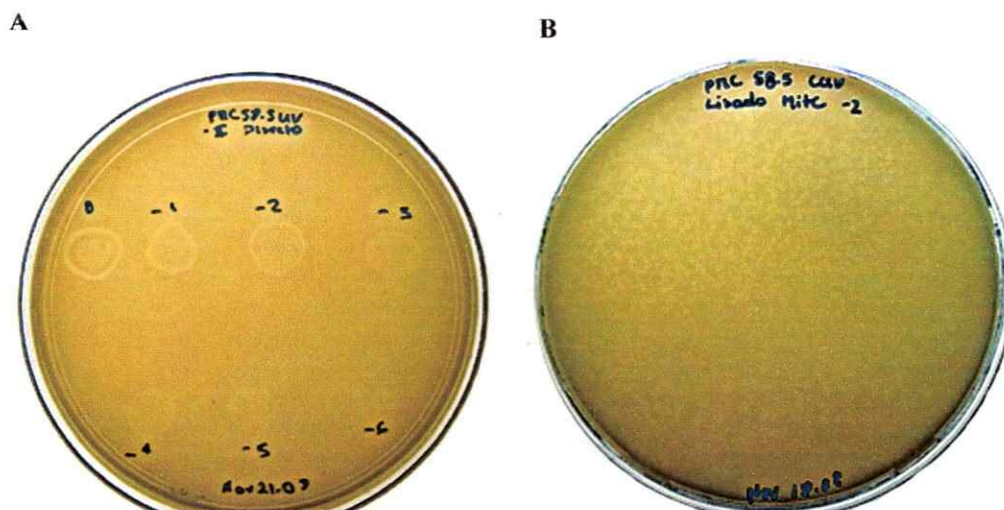


Figura 17. Placas de lisis producidas por el fago VP58.5 sobre la cepa PMC58.5-UVC (curada con luz UV). (A) Ensayo de infección realizado con microgotas de diluciones seriadas del fago sobre un césped de la cepa PMC58.5-UVC. Los números representan las diluciones seriadas en base 10 del fago VP58.5. (B) Infección realizada por el método del doble agar sobre un césped de PMC58.5-UVC mezclado con diluciones del fago VP58.5.

#### 4.3. Determinación del rango de hospedero del fago VP58.5.

Se probaron 89 cepas para determinar la susceptibilidad de infección por el fago VP58.5. El resultado mostró que el fago infecta un rango estrecho de cepas. El 37% de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* probadas fueron infectadas, con título alrededor de  $10^9$  UFP/ml (Tabla 7 y Anexo 3). Ninguna de las otras cepas probadas incluyendo *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. mimicus*, *V. cincinnatiensis*, *V. metschnikovii* y *V. parahemolyticus* no pandémicos fueron sensibles.



Tabla 7. Sensibilidad de distintas cepa y especies de *Vibrio* al fago VP58.5.

Cepas Probadas	Cepas Analizadas	Cepas Infectadas
<i>V. parahaemolyticus</i> no pandémicas: PMA3.5, PMA45.5, PMA112, PMA2.5, PMA339, PMA16.5, PMA337, PMA189, PMA79, PMA27.5, PMA19.5, PMA22.5, PMA1.5, PMA13.6, PMA34.6, PMA40.6, PMA1.7, PMA11.7, PMA21.7, CH1055, CH1314, CH1315, CH1385, CH1386, CH1387, CH1405, CH1460, CH1443, CH1538, CH465, CH464, CH463, CH462, CH460, CH459, CH445, CH439, CH1536, CH1534, CH1473, CH470, CH467, CH466, CH443, CH442, CH441, CH437.	47	0
<i>V. parahaemolyticus</i> pandémicas: <u>PMA37.5</u> , <u>PMC14.6</u> , <u>PMC68</u> , <u>PMC34</u> , <u>PMC6.8</u> , <u>PMC4.6</u> , <u>PMC2.8</u> , <u>PMC10.6</u> , <u>PMC1.7</u> , <u>PMC58.5-UVC</u> , PMC61, PMC41, PMC52, PMC15.5, PMC41.5, PMC56.5, PMC2.5, PMC10.5, PMC2.6, PMC6.6, PMC11.7, PMC50.7, PMC75.7, PMC60.7, PMC19.8, PMC22.8, PMC28.8.	27	10
<i>V. cholerae</i> : Vc3	1	0
<i>V. alginolyticus</i> : CH454, CH451, CH446, Va2, Va3	5	0
<i>V. vulnificus</i> : CH444, CH472	2	0
<i>V. harveyi</i> : DSM2332, DSM6904	2	0
<i>V. anguillarum</i> : CH492, CH491	2	0
<i>V. mimicus</i> : CH386	1	0
<i>V. cincinnatiensis</i> : CH1271	1	0
<i>V. metschnikovii</i> : CH419	1	0

Las cepas subrayadas fueron las cepas sensibles a la infección por el fago VP58.5.

La presencia del profago VP58.5 parece ser específica a las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, la presencia del profago se exploró más a fondo analizando la posible existencia de genes de VP58.5. Se realizó la búsqueda del profago en 17 cepas pandémicas del 2007 y en una cepa tipo de cada uno de los 21 grupos DGREA (Fuenzalida y col., 2006). El análisis de cepas se realizó por

medio de amplificaciones por PCR con los genes (ORF1, ORF24 y ORF34) del fago. No se obtuvo amplificación de genes del fago en ninguna de las cepas estudiadas. De estos ensayos se concluyó que el profago VP58.5 es específico de cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* y no está presente en cepas de *V. parahaemolyticus* no pandémicas.

#### 4.4. Estudio de la lisogenia por el fago VP58.5.

El fago VP58.5 infecta el 37% de las cepas pandémicas analizadas formando placas de lisis en medio sólido (ver Anexo 3). Para indagar si las cepas resistentes observadas después de infectar, debían esta propiedad a la lisogenización por el fago, se analizaron por la presencia del DNA del profago, por extracción con lisis alcalina y por inducción con mitomicina C. Cuando se examinaron las bacterias resistentes, un tercio (7 de 25 cepas analizadas) mostró que se hacen resistentes, debido a la presencia del fago. Estas bacterias resistentes contienen el DNA del profago y son inducidas con mitomicina C (Anexo 3).

## DISCUSION

El desarrollo de esta tesis contribuyó a encontrar una variante lisogénica del clon pandémico conteniendo el nuevo fago temperado telomérico VP58.5. La caracterización detallada y la secuenciación del fago junto con la determinación del efecto de su presencia permitieron postular que el fago VP58.5 puede tener consecuencias críticas en la sobrevivencia de *V. parahaemolyticus* en el mar.

### 1. Caracterización de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*.

Los hallazgos obtenidos en esta tesis revelaron la presencia de bacterias variantes en el clon pandémico de *V. parahaemolyticus*, obtenidas en su ambiente natural. Estas variantes se caracterizan por presentar variaciones en los patrones de restricción de los DGREAs y en los RFPL-PFGE. Esta tesis se centró en la caracterización del grupo de variantes más abundantes, el grupo 1, con 14 aislados. Las variantes de este grupo contienen un DNA extracromosomal de 42 Kb (grupo 1). Este DNA extracromosomal puede ser recuperado con lisis alcalina, indicando una posible conformación del DNA de doble cadena circular y cerrado, con un comportamiento similar a un plasmidio (Fig. 3B). Este plasmidio se encuentra en aproximadamente 10 copias por célula. En la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* se han reportado plásmidos de diferente tamaño desde 1,8 a 140 Kb (Martinez-Urtaza y col., 2004). Pero el plasmidio de 42 Kb no ha sido reportado previamente y no está presente en los aislados del sudeste Asiático, ni en los aislados chilenos iniciales, de 1998 y del 2004 (Tabla 4). Al parecer este DNA de 42 Kb fue introducido en parte de la población del clon pandémico a lo largo de la costa

Chilena a partir del 2005 generando en el clon pandémico de *V. parahaemolyticus* nuevas variantes no observadas anteriormente. La determinación de la presencia del plasmidio de 42 Kb puede incluirse en un futuro como uno de los marcadores moleculares para la clasificación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*, mediante la determinación del perfil de plasmidios.

## **2. Caracterización de las variantes con el DNA extracromosomal de 42 Kb.**

La caracterización de las variantes del grupo 1 se inició con la determinación de la diversidad del DNA de 42 Kb encontrado en las variantes, mediante los análisis de RFLP. Los resultados mostraron la existencia de patrones de restricción idénticos, indicando la presencia del mismo tipo de DNA en todas las variantes. Aunque se podrían complementar con experimentos de hibridación de DNA-DNA, como un medio para analizar pequeñas diferencias no observables por RFLP. La secuenciación de pequeños fragmentos de DNA del plasmidio de 42 Kb mostraron un porcentaje de identidad de secuencia entre 81 a 99% con el fago VHML de *V. harveyi* (Tabla 5). Resultados similares se obtuvieron con las amplificaciones por PCR de 5 genes específicos de VHML que codifican para la proteína protelomerasa, proteína de la cápside, proteína portal, proteína contráctil de la vaina y proteína del plato-base. La secuenciación de 3 de éstos amplificados mostró una identidad nucleotídica de 93 a 98% con el fago VHML (Tabla 6). Los resultados anteriores de similitudes de secuencias con VHML, la presencia de genes específicos de fagos, junto con la inducción con mitomicina C y la irradiación con luz UV (Fig. 5 y 14), sugirieron que el plasmidio de 42 Kb correspondía a un fago temperado no integrado

al cromosoma bacteriano. El fago fue denominado VP58.5, (VP por *Vibrio Parahaemolyticus* y 58.5 corresponde a la cepa tipo de donde se aisló el fago, PMC58.5).

En la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* se ha reportado la presencia de dos fagos. El primer fago observado fue el fago filamentosos f237. Es un fago integrado en el cromosoma con un tamaño de 8,8 Kb. De los ORFs de este fago, se utiliza el ORF 8 como un marcador genético de identificación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* que se observó a partir de 1996 (Nasu y col., 2000). La presencia de VP58.5 no se ha observado que se afecte por el fago f237. Una observación similar de la presencia de profagos, con morfologías distintas dentro una misma bacteria ha sido reportado en la cepa Sakai de *E. coli* O157:H7 (Canchaya y col., 2003; Ohnishi y col., 2001). En esta cepa se han identificado por análisis genómicos 18 profagos, la mayoría de los cuales son fagos tipo lambda, P2 y Mu.

El segundo fago aislado de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* es el fago VP882, (Lan y col., 2009). Su genoma es de 38,2 Kb, no se integra en el cromosoma de la bacteria hospedera y puede mantenerse como un plasmidio lineal con los extremos covalentemente unidos en la célula lisogenizada, similar a como se comporta el fago VP58.5.

La inducción con mitomicina C de de la lisis, produce partículas virales que poseen una cápside icosaédrica de 60 nm de ancho, una cola contráctil de 160 nm largo por 6 nm de ancho, envuelta por una vaina de 15 nm ancho (Fig. 6). De acuerdo a las características morfológicas, este fago se incluiría en la familia

*Myoviridae*, del orden Caudovirales, según la clasificación de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Ackermann y col., 2003). El fago VP58.5 aparte de tener identidades de secuencia nucleotídicas de 81 a 99% con VHML, tiene una morfología de la partícula viral similar a este fago, el cual tiene una cápside icosaédrica de 40 a 50 nm diámetro y una cola contráctil de 200 nm de longitud. El fago VHML ha sido clasificado también como un myovirus (Oakey y col., 2000). En la microscopía electrónica de VP58.5 se observan 2 tipos de partículas, una con la cola contraída (Fig. 6A) y partículas virales sin contraer la cola (Fig. 6B). Estos dos tipos de partículas corresponden al mismo fago, lo cual fue confirmado por análisis de DNA, donde los 2 tipos de partículas tienen DNA del mismo tamaño y patrones de restricción indistinguibles (resultados no mostrados).

### **3. Caracterización del fago VP58.5.**

La proteína protelomerasa está presente en un grupo de fagos teloméricos que ha sido descrito recientemente e incluye los fagos N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1, VP882 (Rybchin y Svarchevsky, 1999; Hertwig y col., 2003a; Casjens y col., 2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009). Los fagos teloméricos se caracterizan por tener un DNA lineal con extremos cohesivos. En cambio el profago es un plasmidio lineal con los extremos covalentemente unidos, que no se integra en el cromosoma de la célula hospedera. La caracterización en detalle de VP58.5 se centró en determinar si este “nuevo” fago pertenece al grupo de fagos teloméricos.

### 3.1. Extremos covalentemente unidos en el profago VP58.5.

Los extremos covalentemente unidos en el profago VP58.5 fueron determinados al comparar y analizar los DNAs del fago y profago. El DNA del fago VP58.5 tiene tamaño igual al del plasmidio de 42 Kb (Fig. 7). Pero el DNA de la partícula viral no puede ser recuperado con extracción alcalina, como si ocurre con el plasmidio, indicándonos que existen conformaciones del DNA diferentes entre el fago y plasmidio (Fig. 3B). Esto es debido a que el plasmidio puede renaturar las hebras complementarias rápidamente después de la desnaturación alcalina, como ocurre con un DNA circular y cerrado, mientras que el DNA lineal del fago no puede renaturar después de la desnaturación. Las diferentes características entre fago y plasmidio (profago) también se evidenciaron con el mapa de restricción de ambos DNAs (Fig. 8). En el mapa de restricción se observó que los DNAs tienen el mismo número de fragmentos, revelando una naturaleza lineal y una permutación circular entre los DNAs del fago y profago de un 35% aproximadamente. Los anteriores resultados junto a la presencia del gen putativo de la protelomerasa, que está presente en los fagos teloméricos que se replican como un plasmidio lineal con los extremos covalentemente unidos, indican que el profago consiste en un DNA lineal con los extremos covalentemente cerrados en lugar de un DNA circular y cerrado. Los cambios en los patrones de migración observados en las electroforesis en condiciones desnaturalantes confirmaron que los extremos de las hebras complementarias del DNA del profago están unidos covalentemente (Fig. 9).

Los plasmidios con las hebras complementarias covalentemente unidas en sus extremos han sido observados en el grupo de fagos teloméricos que incluye los fagos N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1, VP882 y VP58.5 (Rybchin y Svarchevsky, 1999;

Hertwig y col., 2003a; Casjens y col., 2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009). Sin embargo, VHML, a pesar de su similitud en la secuencia de DNA con VP58.5, no ha sido reportado como fago telomérico. Tampoco su profago ha sido descrito como un plasmidio lineal con los extremos covalentemente cerrados. Se ha postulado en cambio que el profago de VHML se integra en el cromosoma de la célula hospedera, a pesar que tiene el gen de la protelomerasa (Oakey y col., 2000 y Oakey y col., 2003).

Es probable que la conformación de un profago tipo plasmidio lineal pueda tener ciertas ventajas. En este estado el fago no tendría las limitaciones que tiene un fago temperado que se integra en el cromosoma, como son el replicarse y segregarse junto con el cromosoma de la célula huésped, tener una secuencia blanco específica para la recombinación y requerir las enzimas integrasas y excisionasas para la integración y posterior escisión. La escisión puede resultar en pérdida de genes específicos del fago al producirse errores en el proceso (Campbell, 2006). Además, estos profagos tipo plasmidio lineal pueden ser transferidos independientemente por procesos de conjugación y transformación (Mobberley y col., 2008). La presencia del gen de la protelomerasa en el genoma de siete fagos (N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1, VP882, VHML y VP58.5) que tienen diferentes hospederos y ambientes, indica que el estado de profago tipo plasmidio lineal puede ser una estrategia común de lisogenia aunque solo haya sido descubierta en los últimos años (Mobberley y col., 2008).

Se ha reportado que los profagos de N15 y PY54 pueden ser transferidos mediante transformación (Rybchin y Svarchevsky, 1999; Hertwig y col., 2003a). Este tipo de experimentos realizase para transferir el profago VP58.5 y emplearlo como



una herramienta genética para introducir genes específicos en la cepa pandémica *V. parahaemolyticus*.

### 3.2. Extremos cohesivos del fago VP58.5.

El fago VP58.5 tiene 11 nucleótidos que sobresalen en el extremo 5' formando así los extremos cohesivos (Fig. 10). Se ha reportado que el fago N15 tiene 12 bases que sobresalen en el extremo 5' (Rybchin y Svarchevsky, 1999), los fagos PY54 y  $\phi$ KO2 tienen extremos cohesivos de 10. bp y sobresalen en el extremo 3' (Hertwig y col., 2003a y Casjens y col., 2004). El fago VP882 tiene extremos cohesivos de 9 bases (Lan y col., 2009). El fago  $\phi$ HAP-1 no parece tener extremos cohesivos pero no se integra en el cromosoma de la célula y se mantiene como un plasmidio lineal en la célula hospedera (Mobberley y col., 2008). En el caso del fago VHML, este fago no poseería extremos cohesivos y tendría en cambio secuencias repetidas invertidas de 33 bp (de cadena doble) (Oakey y col., 2002). Estas secuencias repetidas invertidas ubicadas en los extremos del DNA del fago VHML, corresponderían a los extremos del profago VP58.5. Según Oakey y col, estos repetidos invertidos serían el sustrato para la integración del fago en el cromosoma de la célula hospedera. El mecanismo de integración sugerido para VHML es similar al del fago Mu, el cual después de la infección de un hospedero susceptible, se integra en el cromosoma bacteriano por un mecanismo de transposición (Oakey y col., 2002). El modelo de transposición postulado para VHML sería una recombinación sitio-específica entre el repetido invertido y una secuencia específica en el hospedero. Se ha propuesto que en esta recombinación participarían la proteína

de recombinación (ORF10), la proteína transposasa putativa (ORF 37) y la protelomerasa (ORF 1) (Oakey y col., 2002).

### 3.3. Secuenciación del fago VP58.5.

La determinación de la secuencia nucleotídica del fago VP58.5 mostró una organización genómica similar a la de los fagos teloméricos reportados N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1 y VP882. Los fagos VP58.5 y VHML aparte de tener morfologías similares tienen un promedio de identidad de secuencia aminoacídica de 92%. Dada la gran similitud presente entre los fagos VP58.5 y VHML, estos fagos serían mosaicos, que comparten grupos y funciones de genes similares. Sin embargo los mapas y estructura publicados para VHML son muy diferentes a los que encontramos para VP58.5. El genoma de VP58.5 puede ser dividido en brazos izquierdo y derecho. El brazo izquierdo contiene los genes que codifican para proteínas de empaquetamiento de DNA, ensamble de la cabeza, ensamble de la cola y la proteína partición. En el brazo derecho están los genes de inmunidad, la protelomerasa y replicación. La protelomerasa es esencial para la conversión del fago lineal en un plasmidio lineal con los extremos covalentemente unidos. Además la protelomerasa participa en la replicación del plasmidio, por medio del procesamiento del sitio de resolución del telómero (site *te/RL*). Las protelomerasas de VP58.5 y VHML tienen una identidad de secuencia aminoacídica de 92% y contienen todos los motivos conservados de las otras protelomerasas de fagos teloméricos (Aihara y col., 2007). El sitio *te/RL* es una secuencia repetida invertida y es el blanco para la protelomerasa, la cual después del procesamiento de este sitio genera el plasmidio

lineal. El repetido invertido o sitio *telRL* es de 88 bp en (VP58.5), 66 bp en (VHML), de 56 bp en (N15), 42 bp en (PY54), 50 bp ( $\phi$ KO2) y de 92 bp en ( $\phi$ HAP-1) (Rybchin y Svarchevsky, 1999; Hertwig y col., 2003a; Casjens y col., 2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009).

La comparación del sitio *telRL* entre VP58.5 y VHML mostró que 24 bp que están ubicadas en la parte central de VP58.5 no están presentes en la secuencia reportada para VHML (Fig. 12B). Estas diferencias podrían explicar el porqué a pesar de tener secuencias similares el comportamiento de los fagos VP58.5 y VHML es tan diferente. La región central del sitio *telRL* es el blanco para el procesamiento por la protelomerasa. Por lo tanto es posible que en VHML el sitio *telRL* no sea un sustrato para la protelomerasa y debido a esto, el profago tipo plasmidio lineal no fuera generado. Para confirmar la importancia de los nucleótidos centrales del sitio *telRL* de VP58.5, en la formación del plasmidio lineal, se podrían introducir deleciones mediante recombinación homóloga dentro del sitio *telRL* de VP58.5. Además, se podría purificar la protelomerasa de VP58.5 y usarla para ensayos in vitro de procesamiento de los sitios *telRL* de VP58.5 y VHML.

En conclusión hay descrito siete fagos temperados que poseen el gen de la protelomerasa (N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1, VP882, VHML y VP58.5). Seis de los 7 fagos (N15, PY54,  $\phi$ KO2,  $\phi$ HAP-1, VP882 y VP58.5) han sido descritos como fagos teloméricos (Rybchin y Svarchevsky, 1999; Hertwig y col., 2003a; Casjens y col., 2004; Mobberley y col., 2008; Lan y col., 2009; Zabala y col., 2009b). De acuerdo a la morfología viral, los fagos teloméricos pueden dividirse en dos subgrupos, los siphovirus que incluye N15, PY54 y  $\phi$ KO2, aislados de *Enterobacteriaceae* y los

myovirus  $\phi$ HAP-1, VP882 y VP58.5, aislados de bacterias marinas. Los fagos pertenecientes a los siphovirus, son similares al fago lambda ( $\lambda$ ) con respecto a la longitud del genoma, a la morfología del fago y placas de lisis, periodo de latencia y frecuencia de lisogenización (Ravin, 2006). En el caso de los myovirus estos fagos comparten la misma morfología, tienen una cola contráctil y la presencia de una región de collar o “neck” entre la cápside y la cola, además contienen genomas de menos de 50 Kb (Mobberley y col., 2008 y Oakey y col., 2000). Sin embargo, a pesar de la variedad y el hecho que los siphovirus y los myovirus pertenecen a familias diferentes, los fagos teloméricos descritos tienen similitudes en las propiedades de fago y profago, así como del contenido y organización génica (Lima-Mendez y col., 2008). La excepción dentro de este grupo sería el fago VHML que aunque tiene el gen que codifica para la protelomerasa y es un myovirus aislado de una bacteria marina, no ha sido clasificado aún como un fago telomérico.

De los 58 ORFs identificados en VP58.5, hay 6 ORFs que fueron asignados a proteínas no relacionadas con fagos. Los ORFs (12 y 17) que codifican para la proteína hipotética Shewmr7\_0744 de *Shewanella* sp. MR-7 y para la proteína hipotética Sbal195\_2898 de *Shewanella baltica* OS195, probablemente fueron adquiridos por infección a cepas de *Shewanella* generalmente encontradas en el mar (Venkateswaran y col., 1999). No es clara la relación de un ORF del fago VP58.5 con la proteína hipotética C0967 de *E. coli* cepa CFT073. Esta proteína ha sido encontrada en una cepa uropatogénica de *E. coli* que causa entre 70 a 90% de las infecciones del tracto urinario adquiridas en la comunidad (Luo y col., 2009). La función de los restantes tres ORFs (29, 33 y 52) en el fago VP58.5 es desconocida,

ya que están relacionadas con regulador *tcdA-E* de *Bacillus cereus* ATCC 14579, la subunidad reguladora del proteasoma de *Pseudoalteromonas tunicata* D2 y para la proteína hipotética Pput\_4147 *Pseudomonas putida* F1.

### 3.4. Composición de proteínas del fago VP58.5.

Las partículas virales del fago VP58.5 concentradas por gradientes de densidad en CsCl mostraron la presencia de 3 bandas cuyas densidades fueron, B1= 1,22 g/ml, B2= 1,27 g/ml y B3= 1,41 g/ml. Los datos obtenidos mostraron que la banda B3 contiene aproximadamente 10 veces la cantidad de DNA presente en la banda B1 (Fig. 13A). Mientras que el perfil de proteínas de estas 2 bandas es inverso al contenido de DNA; en función de la razón proteína – DNA (estimada para el DNA por la tinción con bromuro de etidio y las proteínas estimadas por tinción con azul de coomasie) (Fig. 13B). Las diferencias en el contenido de DNA probablemente se deben a que las partículas virales de la banda B1 han perdido gran parte de su DNA y esto se asocia con la cola contraída (Fig. 6A). Mientras que las partículas virales de la banda B3, no tienen contraída la cola, indicando que no habrían inyectado su DNA (Fig. 6B) y por lo tanto su contenido de DNA y su densidad son mayores.

## 4. Efecto de la presencia del fago VP58.5 en el crecimiento de *V. parahaemolyticus*.

La presencia del profago VP58.5 tiene un significativo efecto en la sensibilidad a la radiación con luz UV y a la radiación solar, debido a la inducción del profago y a la lisis celular consecuente. Este fenómeno ha sido reportado en

*Shewanella oneidensis* MR1, que habita ambientes en acuáticos y sedimentos. En esta cepa se observó que la activación de profagos es el mayor factor letal al irradiar con luz UV (Qiu y col., 2005). El efecto de la alta sensibilidad a la luz UV fue revertido al curar el plasmidio con naranja de acridina o bacterias curadas después de la irradiación con UV. Las cepas curadas tienen un comportamiento similar a las cepas que no tienen el plasmidio, indicando que la presencia del profago produce muerte celular debido a su inducción. La muerte de células lisogenizadas por la inducción de fagos temperados es uno de los modos de muerte bacteriana debido a la infección de fagos (Hewson y col., 2007; Weinbauer y col., 1996). Los fagos marinos son generalmente componentes críticos de los ecosistemas, donde juegan un papel importante en la mortalidad, expresión génica y evolución bacteriana (Paul y col., 2008). Los fagos virulentos lisan directamente el hospedero. Mientras que los fagos temperados pueden incrementar la sensibilidad del hospedero a factores ambientales como la luz UV, radiación solar, cambios en la temperatura y condiciones de hambruna, con cada una de estas condiciones se observó que el fago VP58.5 se induce formando partículas virales.

La presencia de bacterias sensibles y resistentes dentro de la población pandémica de *V. parahaemolyticus* sugiere que una población resistente puede estar siendo seleccionada. VP58.5 infecta sólo el 37% de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* probadas, mientras que un tercio de las cepas que se hacen resistentes debido a que están lisogenizadas. Estas cepas resistentes al poseer el profago VP58.5 son nuevamente sensibles a la inducción del fago temperado y a la lisis celular. El fago VP58.5 podría usarse en un futuro como una herramienta para controlar los brotes de *V. parahaemolyticus* pandémico, aprovechando que infecta el

37% y lisogeniza un tercio de de las cepas pandémicas probadas, se podría alcanzar a controlar aproximadamente la mitad de la población pandémica de *V. parahaemolyticus* en Chile, lo cual aportaría considerablemente al descenso de los casos de diarrea en el país.

En las cepas del 2007, el profago VP58.5 no fue observado, posiblemente por la presencia de nuevas cepas pandémicas observadas ese año, las cuales contenían cambios del serotipo a O3:K59 y por cepas que fueron genotípicamente diferentes a la cepa pandémica (Harth y col., 2009). Estas nuevas cepas observadas en el 2007, al parecer no fueron susceptibles a la infección por el fago VP58.5.

Entre VP58.5 y VHML aparte de las diferencias con respecto a la organización génica, estado del profago, el sitio *telRL* y extremos del fago, está el diferente rango de hospedero. Ninguna de las cepas de *Vibrio* sp. probadas fue infectada con VP58.5, incluyendo *V. harveyi*. Es probable que esto sea debido a que tienen solo una identidad de secuencia aminoacídica de 77% en las proteína de la fibra de la cola y por tanto diferentes receptores en la superficie celular bacteriana. La diferencia entre VP58.5 y VHML es sorprendente debido a su gran similitud en sus genomas. Debido a estas observaciones se intentó desde el inicio del hallazgo de VP58.5 obtener VHML para realizar estudios comparativos. Por lo tanto se le escribió al Dr. Leigh Owens (James Cook University, Townsville, Australia) en varias oportunidades para obtener una cepa del fago, pero no se obtuvo ninguna respuesta. Intentos similares realizaron los investigadores, Stefan Hertwig, (Instituto Federal de Riesgo y Aseguramiento, Alemania) y Hans Ackermann, (Universidad Laval, Canadá), pero ellos tampoco obtuvieron ninguna respuesta, ni lograron obtener el fago o la cepa lisogenizada con este fago (comunicación personal). Por lo

tanto fue imposible obtener el VHML para realizar los experimentos de comparación con VP58.5. John H. Paul (Universidad del Sur de la Florida, USA) escribió en su paper del análisis del fago  $\phi$ HAP-1 (Mobberley y col., 2008, J. Virol., 82:6618-30): “VHML has only been sequenced, and there is limited knowledge of the host-phage system, which has since been lost”.

El desarrollo de esta tesis permitió demostrar que la alta sensibilidad a la radiación solar de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* ocurre por la infección por el fago temperado telomérico VP58.5. Debido a este efecto la presencia del fago puede tener consecuencias críticas en la persistencia y propagación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en el mar y afectar la intensidad de los brotes de diarrea asociados al consumo de mariscos.



## CONCLUSIONES

1. Las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* aisladas en Chile frecuentemente poseen un plasmidio de 42 Kb, el cual corresponde a un profago telomérico.
2. El fago VP58.5, prototipo del grupo de fagos teloméricos encontrados, presenta las características de este grupo: no integra su genoma en el cromosoma de la célula hospedera. El DNA del fago es lineal y tiene los extremos cohesivos. El DNA del profago VP58.5 es un plasmidio lineal con extremos covalentemente unidos. Fago y profago tienen la misma secuencia nucleotídica pero tienen los genes de su genoma permutado en un 35%.
3. El fago tiene un genoma con una secuencia nucleotídica de 42.612 nucleótidos y tiene en promedio un 92% de identidad aminoacídica con el fago VHML de *V. harveyi*. A pesar de la similitud en las secuencias, estos dos fagos tienen diferencias en el estado del profago, el sitio *teIRL* y los extremos del DNA del fago. Estas diferencias pueden explicar porque, a pesar de ser tan similares VHML parece integrarse en el estado de profago.

4. VP58.5 tienen un rango de huésped acotado y sólo el 37% de las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus* probadas, indicando que existe diversidad de sensibilidad dentro de los aislados pertenecientes al clon pandémico.
  
5. La presencia del profago VP58.5 incrementa la sensibilidad a la luz UV incluyendo la radiación solar y puede así tener un importante papel en la reducción de la sobrevivencia y la capacidad de propagación de la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus* en el mar.
  
6. El aumento de sensibilidad puede disminuir la carga bacteriana de *V. parahaemolyticus* pandémicos en los mariscos y en esta forma bajar la intensidad de los brotes de diarrea asociados al consumo de mariscos.

**BIBLIOGRAFIA**

Ackermann, H. 2003. Bacteriophages observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154: 245-251.

Aihara H., Huang W., y Ellenberger T. 2007. An interlocked dimer of the protelomerase TelK distorts DNA structure for the formation of hairpin telomeres. *Mol Cell.* 27:901-13.

Alam J., Miyoshi S., y Shinoda S. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. *Environ. Microbiol.* 5:706-10.

Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J, Zhang Z., Miller W., y Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Ansaruzzaman M., Marcelino L., Deen J., Bhuiyan N., Wang X., Safa A., Sultana M., Chowdhury A., Nair B., Sack D., Seidlein L., Puri M., Ali M., Chaignat C., Clemens J., y Barreto A. 2005. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J. Clin. Microbiol.* 43:2559-2562.

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.

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.

Bej A., Patterson D., Brasher C., Vickery M., Jones D., y Kaysner C. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. J. Microbiol. Methods. 36: 215-225.

Bergh O., Borsheim K., Bratbak G., y Heldal M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature. 340:467-468.

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.

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.

Cabello F., Espejo R., Hernandez M., Rioseco M., Ulloa J., y Vergara J. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. Emerg. Infect. Dis. 13:655-656.

Campbell, A. 2006. General aspects of lisogeny. En Calendar R., y Abedon S (eds), The Bacteriophages. pp 66 – 73. Oxford University Press, New York.

Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., y Brüssow. 2003. Prophage genomic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:238-276.

Casjens S., Gilcrease E., Huang W., Bunny K., Pedulla M., Ford M., Houtz J., Hatfull G., y Hendrix R. 2004. The  $\phi$ KO2 linear plasmid prophage of *Klebsiella oxytoca*. J. Bacteriol. 186:1818-1832.

- Chowdhury A., Ishibashi M., Thiem V., Tuyet D., Tung T., Chien B., Seidlein L., Canh D., Clemens J., Trach D., y Nishibuchi M. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1998. *Microbiol. Immunol.* 48:319-327.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Deneke J., Ziegelin G., Lurz R., y Lanka E. 2000. The protelomerase of temperate *Escherichia coli* phage N15 has cleaving-joining activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:7721-7726.
- Eggers C., y Samuels D. 1999. Molecular evidence for a new bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 181:7308-13.

Espejo R., y Escanilla D. 1993. Detection of HIV1 DNA by a simple procedure of polymerase chain reaction, using 'primer-dimer' formation as an internal control of amplification. *Res. Virol.* 144:243-246.

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.

Fuenzalida L., Armijo L., Zabala B., Hernández C., Rioseco M.L., Riquelme C., y Espejo R. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117:270-75.

Fuhrman, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature.* 399:541-548.

Girons S., Bourhy P., Ottone C., Picardeau M., Yelton D., Hendrix RW., Glaser P., y Charon N. 2000. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* 182:5700-5705.

González-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.* 11:129-31.

González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., Romero J., Espejo RT., Jaykus LA., y DePaola A. 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J. Bacteriol.* 190:2831-2840.

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.

Harth E., Matsuda L., Hernández C., Rioseco M., Romero J., González-Escalona N., Martínez-Urtaza J., y Espejo R. 2009. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 163-168.

Hazen H., Wu D., Eisen A., y Sobecky A. 2007. Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 73:7703-7710.

Hewson I., y Fuhrman J. 2007. Characterization of lysogens in bacterioplankton assemblages of the southern California borderland. *Microb. Ecol.* 53:631-8.

Hertwig S., Klein I., Lurz R., Lanka E., y Appel B. 2003a. PY54, a linear plasmid prophage of *Yersinia enterocolitica* with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* 48:989-1003.

Hertwig S., Klein I., Schmidt V., Beck S., Hammerl J., y Appel B. 2003b. Sequence analysis of the genome of the temperate *Yersinia enterocolitica* phage PY54. *J. Mol. Biol.* 331:605-622.

Hertwig S. 2007. Linear plasmid and prophages in gram-negative bacteria. *Microbiol. Monogr.* 7:141-162.

Ikeda H., y Tomizawa J. 1968. Prophage P1, and extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* 33:791-8.

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.

Jumas-Bilak E., Michaux-Charachon S., Bourg G., Ramuz M., y Allardet-Servent A. 1998. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 180:2749-55.

Kaysner C.A. y DePaola A. 2004. Bacteriological Analytical Manual Online. *Vibrio*. US Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition [WWW document]. URL <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-9.html>.

Keyhani J., Keyhani E., Attar F., y Haddadi A. 2006. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:238–242.

Kimura B., Sekine Y., Takahashi H., Tanaka Y., Obata H., Kai A., Morozumi S., y Fujii T. 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Methods.* 72:313-20.

Kinashi H., Shimaji M., y Sakai A. 1987. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature.* 328:454-456.

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.

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



Leitet C., Riemann B., y Hagstrom A. 2006. Plasmid and prophage in Baltic Sea bacterioplankton isolates. *J. Mar. Bio. Ass. UK.* 86: 567-575.

Lima-Mendez G., Helden van J., Toussaint A., y Leplae R. 2008. Reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes. *Mol. Biol. Evol.* 25:762-777.

Luo C., Hu G., y Zhu H. 2009. Genome reannotation of *Escherichia coli* CFT073 with new insights into virulence. *BMC Genomics.* 10:552.

Malinin A., Vostrov A, Rybchin N., y Svarchevsky A. 1992. Structure of ends of linear plasmid N15. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 5-6:19-22.

Mardanov A., y Ravin N. 2009. Conversion of linear DNA with hairpin telomeres into a circular molecule in the course of phage N15 lytic replication. *J. Mol. Biol.* 391:261-268.

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., T Rammamurthy., 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.

McDonnell M., Simon M., y Studier F. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110:119-146.

- Mobberley J., Authement N., Segall M., y Paul J. 2008. The temperate marine phage  $\phi$ HAP-1 of *Halomonas aquamarina* possesses a linear plasmid-like prophage genome. *J. Virol.* 82:6618-6630.
- 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.
- Olea A.M., González 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.
- Oakey J., y Owens L. 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. App. Microbiol.* 89:702-709.
- Oakey J., Cullen B., y Owens L. 2002. The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. *J. App. Microbiol.* 93:1089-1098.
- 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.
- Ohnishi M., Kurokawa K., y Hayashi T. 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol.* 9:481-485.

- Paul, J. H. 1999. Microbial gene transfer: an ecological perspective. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:45–50.
- 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.
- Plasterk R., Simon M., y Barbour A. 1985. Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature.* 318:257-63.
- Qiu X., Sundin G., Wu L., Zhou J., y Tiedje J. 2005. Comparative analysis of differentially expressed genes in *Shewanella oneidensis* MR-1 following exposure to UVC, UVB, and UVA radiation. *J. Bacteriol.* 187: 3556–3564.
- Rahn R., Bolton J., y Stefan M. 2006. The iodide/iodate actinometer in UV disinfection: determination of the fluence rate distribution in UV reactors. *Photochem. Photobiol.* 82:611–615.
- Ravin, V., Ravin N., Casjens S., Ford E., Hatfull F., y Hendrix W. 2000. Genomic sequence and analysis of the atypical temperate bacteriophage N15. *J. Mol. Biol.* 299:53-73.
- Ravin V. 2003. Mechanisms of replication and telomere resolution of the linear plasmid prophage N15. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:1–6.
- Ravin N. 2006: N15: The linear plasmid prophage. En Calendar R., y Abedon S.T (eds), *The Bacteriophages*. pp 448 – 456. Oxford University Press, New York.
- Rybchin V., y Svarchevsky A. 1999. The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* 33:895-903.

Sambrook J y Russel D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Steward F, y Levin B. 1984. The population biology of bacterial viruses: why be temperate. *Theor. Popul. Biol.* 26:93-117.

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.

Svarchevsky, A., y Rybchin V. 1984. Physical mapping of plasmid N15 DNA. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 10:16-22.

Venkateswaran K., Moser D., Dollhopf M., Lies D., Saffarini D., MacGregor B., Ringelberg D., White D., Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E., y Nealson K. 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2:705-724.

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.

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.

Wong H., Liu S., Wang T., Lee C., Chiou C., Liu D., Nishibuchi M., y Lee B. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3981-3986.

Zabala B., Garcia K, y Espejo R. 2009a. 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., Hammerl J., Espejo R., y Hertwig S. 2009b. The linear plasmid prophage Vp58.5 of *Vibrio parahaemolyticus* is closely related to the integrating phage VHML and constitutes a new incompatibility group of telomere phages. *J. Virol.*83:9313-9320.

ANEXO 1: Lista de partidores diseñados y usados para la secuenciación del fago y profago VP58.5

Partidor	Secuencia
VHML 196R	GTCCATTCCGTCAGTTAGTTTC
VHML 295F	TCGTGTCGCTAAGGATGAG
VHML 309R	CGTTTGTGCTCATCCTTAGC
VHML 352F	GCAATCCACAAATCAGCC
VHML 501R	AAAGAGGGGTCCAGCATCTC
VHML 627R	TCAATGCGAAGACCAAGC
VHML 760F	TGTCAGAAAAGGACCCGTC
VHML 1270F	CAACACAGAACCACTATGAGG
VHML 2403R	TTTATCACCCCAATACCTC
VHML 2613F	TGTCCTGGATACCTATGACG
VHML 2772R	CTAATGGAGGCTAACGCTG
VHML 2912F	CAAACCTAAGCGAAACACCTAC
VHML 3299F	ATCATTGCCGTCTCTTACC
VHML 3444F	TCTTTGCTTGTCCTACTCCC
VHML 3569R	ATTTGCCACCAGCCGTGTTG
VHML 3683F	AAGGAGTTCTTCGGAGTCG
VHML 3888F	CCAATCTCGGAAAGCAGTTC
VHML 4089F	TCTGGTTCACTGAGTAGGAGG
VHML 4479F	ATAAACTGGTTGCTCTCCC
VHML 5002F	TAACCCATTGAGCGGAAC
VHML 5344F	CAGAAATACCATCGGCAAG
VHML 5460F	TTGCCGTGCTCGTTTAGTC
VHML 5464R	GATGGACTAAACGAGCACG
VHML 5872F	TTTCCACTGCTCACGAACG
VHML 6308F	CTGGCTTTTTTTTCGTCCG
VHML 6626F	AGCAACAACAAACGAGCG
VHML 7047F	GCTTTTGTAGCGTTAGCCC
VHML 7693F	GACGAGCATGACAGCAAAGA
VHML 7811R	ATTCAGCGATTCTACGGC
VHML 7872F	ATTCTGGGCTGTTCACTCGG

VHML 8218F	ACCGACTGTGTTGACTGTGC
VHML 8597F	TGCTGTTCGTGTTGGGACTC
VHML 9178F	AGGTCGGCAAAAAGGAACG
VHML 9707F	CGCTCAGTTTGATGCTGATT
VHML 10291F	GCGCACTGTTTAAGTCACCA
VHML 10603F	CTCGGGCAATCATTCTTTGT
VHML 11151F	TTTGCGGTGGCACACAAG
VHML 11505F	GCGATTGCAGCCAGAAATTA
VHML 11917F	TTGGAGTCGGTGGGATGTTAGG
VHML 12488F	TTGTAAAGTGGGCGACCTG
VHML 12954F	GGAGAAAAGAAAACGGAGTG
VHML 13172F	AGTAAGGCTGTGAACGAGGC
VHML 13186R	TTTGGGTGCTTGTTCCTCG
VHML 13777F	TTTTCGTTTGGAGCGTGGG
VHML 14276F	TCGTCTTGATGAGGTTTCAC
VHML 14613F	AACCTCTGAAAGAAAGGGG
VHML 15115F	GTTTCGTCTGCCGTTACCAAT
VHML 15636F	GATAGCAACGCTGCTTGGTT
VHML 15321R	ATTGAGTGGGACGAAGCAGCAC
VHML 16071F	CCTATCCGATGAGCCTATTC
VHML 16028F	ATGTTCTTGCCTACAGGG
VHML 16559F	GTGCGCATCGTTACTTTTGA
VHML 16773F	GCCACAAGCATATTCTGCAGT
VHML 17045F	TACTCCGACCTGCCAAATGC
VHML 17487F	ACACCATGTTGGCTTATCGC
VHML 18079F	GGTCGAACCAGACCAATGAA
VHML 18249R	AACGGTTGATAGCCAGAGGG
VHML 18551F	GAGGTCCAGTCGTTTTACG
VHML 19210F	GGGCTATGGCATCACTTAC
VHML 19664F	GAGCAAAAGTCTGTTATGGAGG
VHML 20079F	TTGGCACCGTCACTATTATC
VHML 20195F	TACACCCAAGCCCAAATG
VHML 20731F	AAAATACCGAAGCCCCTC
VHML 20854R	CCTTCATCCGCCATCTTAG

VHML 21196F	GTCGATGCTCATGCCATTGT
VHMK 21069F	GCCCGTGAGAAAAAAGTG
VHML 21962F	TGTCTGTGGATGTGTCTGAAG
VHML 22261F	CGTTACTACGCGAAGATGGA
VHML 22275F	TCTGCCGTTCAAAAAGTCG
VHML 22256F	ACAAAGACCACAACCTGGCG
VHML 22920F	GGTTCGTTTTTCAGCACACCT
VHML 23458F	GCCGCTTCTCTGTTCAATTGT
VHML 23999F	GTCCCTCTGGTGATTTTGCT
VHML 24004F	AGTGACGGCGGGGAAATAAC
VHML 24495F	TGGCTAAAGCCATTGCAGAG
VHML 24624R	TCTGTGCGTTCATCCCTTGC
VHML 25037F	CCATC'TTGGTCGGTTTCAAT
VHML 25647F	TCCTGCTGGTGATGTGATTC
VHML 26231F	AACGAAAACCTGACCGACG
VHML 26799F	TGGGCTGTCTTTGCGAATG
VHML 27358F	AGCGGTGGAGCATAACTCAG
VHML 27378F	GCGGTCGAAACACAGTCATT
VHML 27544F	CGACATCCGACAACCAAAG
VHML 28040F	GCTGGCAACAATGGTTCA
VHML 28626F	CGACCCTGACCGAATCTTAG
VHML 29163R	CGCCTTTGTTTTTTCCTTTTCGG
VHML 29221F	ACAAAATGTCCCCCTCTCCC
VHML 29096F	TTGATAACAGCCCTTGCG
VHML 29730F	CCATCATTACCACGACAAG
VHML 29855R	CCGTTACTCGTTGAGATGG
VHML 30121F	CGACCCGCAGCTATATGAAT
VHML 29878F	CGAATCATAAATCAGCCGC
VHML 30736F	CACTCAATCCAACGTGATCG
VHML 31238F	CAGCAAAATGGTTTCCGTG
VHML 31419R	TTGTTCACCCCTTCCGTAC
VHML 31690F	CCCCTCCAAAACCTGACTCTC
VHML 31949F	CTGGAAATCTGGCGAAAAAG
VHML 32616F	CGGCTCAGCACTTCTATCAA



VHML 33097F	CAAAGCAAAGAAACGACCC
VHML 32939F	CGAGAAAACAAGTCGCTG
VHML 33225F	CGGCTGAACAGCCTAATGAT
VHML 33702F	TTGATGAGCAGATGGCTGGC
VHML 33660R	AGGTTAGTGTTTGCCGTGG
VHML 33718F	CGTTGGTGCTGTTGCTAATG
VHML 34285F	GGTGAAATCCTTGGTGATG
VHML 34638R	TTCAGCAGCAGACGATAGC
VHML 34885F	GGTTGTTGCATTGATTGCTG
VHML 35065R	ATCCAAACCCAGCCAAGCG
VHML 35440F	GTCATTCTTCGGCTTTGGTG
VHML 35755R	CGATTGAGGCACAGAAACAG
VHML 36029F	TTATATGCTGGCCCTTGGTC
VHML 36454F	GTGGATGACATTTGTTACCG
VHML 36638R	CGCATAGGTCAATCAAACAGTG
VHML 36894F	CAAGATTGTGATTTCGTGCC
VHML 37356F	ACTGCGAAAGACTTACCCTAC
VHML 37385F	TTTGCTCATCGGCTTGG
VHML 38052F	ACAGGACCAAACAGACGCAG
VHML 38174F	TCAGTTCCATCAGGGCATCG
VHML 37592F	AGCCGCTGCTGCCTATTATC
VHML 38052F	TTGTTCTATCGCTGCCTTAG
VHML 38572F	CGAGAAGGCTTTATCCATGC
VHML 38926F	ATTGAGTGGGACGAAGCAGCAC
VHML 39165F	CGTCTTTGGTCATCTCGTAG
VHML 41100R	ATTGAGTGGGACGAAGCAGCAC
VHML 40110F	G TTCACCGTTCCATACCTC
VHML 40677F	GCCACCATCTCGTTAGTTATTC
VHML 41024R	TGCTTGGCTCAATGAACC
VHML 42175F	TCGTCTTCAAATACCCCG
VHML 41229F	CTGGGTTTACTTCGGTTACTC
VHML 41384R	GGCAACAAAACCATCAGCAAC
VHML 41830F	GGTAAAACCCGTTCCCTTC
VHML 43371F	TTCGCAAGCCCAAACATC

VHML 42465F	CCAAGTATTCATAGCCGCTG
VHML 42613R	AGTCCTGCTGGTTGACCTTG
VHML 43008F	CAGTAAAGTCCCAATCGCTC

ANEXO 2: Análisis de los ORFs identificados en el fago VP58.5

ORF	Posición Nucleotídica	Tamaño (bp)	Hebra	Proteínas Relacionadas por (Blastp) realizada en la base de datos del NCBI	E-value	Identidad	Número de Acceso
01	74 - 655	582	+	Subunidad pequeña Terminasa Putativa. ORF 21 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-107	191/193 (98%)	<u>NP_758914.1</u>
02	561 - 2444	1884	+	Subunidad grande Terminasa putativa. ORF 22 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Subunidad grande Terminasa putativa, gp02 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ]	0.0 2,00E-71	626/627 (99%) 192/613 (31%)	<u>NP_758915.1</u> <u>NP_046897.1</u>
03	2437 - 2700	264	+	Proteína hipotética			
04	2700 - 4193	1494	+	Proteína portal putative ORF 23 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0	481/497 (96%)	<u>NP_758916.1</u>
05	4197 - 5468	1272	+	Proteína de la cápside putativa, ORF 24 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína de la cápside, gp05 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ] Proteasa de maduración de la cápside putativa, gp06 [Fago phiK02 <i>Klebsiella oxytoca</i> ]	0.0 8,00E-39 1,00E-38	396/427 (92%) 97/260 (37%) 94/264 (35%)	<u>NP_758917.1</u> <u>NP_892049.1</u> <u>YP_006585.1</u>
06	5477 - 5791	315	+	Proteína putativa relacionada a fagos, ORF25 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-46	99/104 (95%)	<u>NP_758918.1</u>
07	5855 - 6877	1023	+	Proteína hipotética, ORF 26 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0	317/320 (99%)	<u>NP_758919.1</u>
08	6888 - 7253	366	+	Proteína hipotética, ORF 27 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-60	112/116 (96%)	<u>NP_758920.1</u>
09	7255 - 7788	534	+	Proteína hipotética, ORF 28 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína hipotética, gp07 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ] Proteína putativa relacionada a fagos, gp13 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	2,00E-28 4,00E-27 2,00E-24	62/62 (100%) 66/153 (43%) 61/172 (35%)	<u>NP_758921.1</u> <u>YP_001686743.1</u> <u>YP_001039824.1</u>

10	7785 - 8333	549	+	Proteína hipotética, ORF 29 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína hipotética, gp14 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína hipotética, gp08 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	1,00E-102 4,00E-08 2,00E-05	181/182 (99%) 43/177 (24%) 44/150 (29%)	NP_758922.1 YP_001039825.1 YP_001686744.1
11	8221 - 8913	693	+	Proteína putativa del plato-base, ORF 30 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína de ensamble del plato-base V [fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	6,00E-115 6,00E-24	202/205 (98%) 76/200 (38%)	NP_758923.1 YP_001039827.1
12	8915 - 9112	198	+	Proteína hipotética Shewmr7_0744 [ <i>Shewanella</i> sp. MR-7] Proteína hipotética, gp17 [fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	4,00E-11 9,00E-06	37/64 (57%) 28/64 (43%)	YP_736801.1 YP_001039828.1
13	8994 - 9458	465	+	Proteína de ensamble del plato-base putativa, ORF 31 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	3,00E-56	109/109 (100%)	NP_758924.1
14	9460 - 10395	936	+	Proteína de ensamble del base-plato putativa, ORF 32 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	5,00E-177	308/311 (99%)	NP_758925.1
15	10388 - 11131	744	+	Proteína del base-plato putativa, ORF 33 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-137	242/247 (97%)	NP_758926.1
16	10681 - 10424	258	-	Proteína hipotética, C0967 [ <i>Escherichia coli</i> CFT073]	2,00E-08	30/62 (48%)	NP_752897.1
17	11131 - 11667	537	+	Proteína hipotética Sba1195_2898 [ <i>Shewanella baltica</i> OS195] Proteína de la fibra de la cola putativa, ORF 34 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Píocina putativa R2_PP_gp21 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína de la cola putativa, gp13 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	1,00E-61 1,00E-59 7,00E-37 3,00E-35	113/174 (64%) 120/155 (77%) 78/146 (53%) 79/173 (45%)	YP_001555324.1 NP_758927.1 YP_001039832.1 YP_001686749.1
18	11671 - 12903	1233	+	Proteína hipotética, ORF 35 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0	398/410 (97%)	NP_758928.1
19	13000 - 13320	321	+	Proteína conservada S23 ribosomal [ <i>Vibrio</i> sp. 0908]	3,00E-45	87/104 (83%)	YP_001595704.1
20	13317 - 14594	1278	+	DNA-polymerasa dirigida a RNA [ <i>Vibrio</i> sp. 0908] Proteína transcriptasa/madurasa/transposasa putativa, ORF57 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0 8,00E-130	315/421 (74%) 239/298 (80%)	YP_001595703.1 NP_758929.1

21	14518 - 14862	345	+	Proteína hipotética, ORF 38 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-47	91/91 (100%)	NP_758930.1
22	14913 - 16118	1206	+	Proteína contráctil de la cola putativa, ORF 39 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0	375/386 (97%)	NP_758931.1
23	16120 - 16620	501	+	Proteína del tubo de la cola putativa, ORF 40 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-85	160/167 (95%)	NP_758932.1
24	16852 - 17226	375	+	Proteína de la cola putativa, ORF 41 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	8,00E-46	90/94 (95%)	NP_758933.1
25	17398 - 20463	3066	+	Proteína determinadora de longitud de la cola putativa, ORF 43 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.0	884/1023 (86%)	NP_758934.1
26	20420 - 20941	522	+	Proteína de la cola putativa, ORF 44 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	6,00E-97	171/173 (98%)	NP_758935.1
27	20931 - 21137	207	+	Proteína de la cola putativa, ORF 45 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	4,00E-31	67/68 (98%)	NP_758936.1
28	21141 - 22106	966	+	Proteína X de la cola [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	0.003	19/57 (33%)	YP_001039844.1
29	22224 - 22901	678	+	Regulador negativo del operon <i>tedA-E</i> [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	3,00E-156	276/276 (100%)	NP_758937.1
30	23137 - 22928	210	-	Proteína hipotética, ORF 47 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.002	26/73 (35%)	NP_830740.1
31	23979 - 23683	297	-	Proteína hipotética, ORF 50 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0.013	25/65 (38%)	NP_758938.1
32	24207 - 23983	225	-	Proteína hipotética, ORF 41 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	6,00E-16	40/67 (59%)	YP_001039852.1
33	25179 - 24217	963	-	Subunidad reguladora del proteasoma [ <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2]	7,00E-49	96/98 (97%)	NP_758941.1
34	25454 - 25176	279	-	Exonucleasa putativa, gp51 [ <i>Yersinia enterocolitica</i> phage PY54]	3,00E-33	68/98 (69%)	YP_001039856.1
				Proteína hipotética, ORF 47 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	6,00E-29	60/73 (82%)	YP_001039858.1
				Proteína hipotética, ORF 53 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-45	93/182 (51%)	ZP_01133584.1
				Proteína hipotética, ORF 53 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-39	85/183 (46%)	NP_892096.1
				Proteína hipotética, ORF 53 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	4,00E-38	79/79 (100%)	NP_758944.1

35	25663 - 25409	255	-	Proteína hipotética, gp49 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	3,00E-23	52/75 (69%)	<u>YP_001039860.1</u>
36	25871 - 25638	234	-	Proteína hipotética, ORF 54 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-32	71/75 (94%)	<u>NP_758945.1</u>
37	26394 - 26119	276	-	Proteína hipotética, ORF 56 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína hipotética, gp52 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína hipotética, gp32 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	1,00E-25 1,00E-13 0,002	59/85 (69%) 39/83 (46%) 22/52 (42%)	<u>NP_758947.1</u> <u>YP_001039863.1</u> <u>YP_001686768.1</u>
38	27007 - 26366	642	-	Proteína de partición putativa ParA, ORF 58 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína de partición putativa ParA, gp53 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína de partición putativa ParA, gp33 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	4,00E-82 2,00E-71 3,00E-66	151/176 (85%) 137/213 (64%) 122/213 (57%)	<u>NP_758949.1</u> <u>YP_001039864.1</u> <u>YP_001686769.1</u>
39	27610 - 27298	240	+	Proteína hipotética			
40	27688 - 29355	1746	+	Protelomerasa putativa, ORF 01 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Protelomerasa putativa, gp54 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Protelomerasa putativa, gp34 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> phage] Protelomerasa, gp26 [Fago phiKO2 <i>Klebsiella oxytoca</i> ] Protelomerasa, gp29 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ] Protelomerasa [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ]	0,0 7,00E-21 2,00E-19 7,00E-09 3,00E-08 2,00E-06	467/507 (92%) 113/392 (28%) 88/333 (26%) 84/352 (23%) 80/315 (25%) 82/335 (24%)	<u>NP_758994.1</u> <u>YP_001039865.1</u> <u>YP_001686770.1</u> <u>YP_006606.1</u> <u>NP_046924.1</u> <u>NP_892077.1</u>
41	29950 - 30309	360	+	Proteína de unión a DNA putativa, ORF 02 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-53	104/104 (100%)	<u>NP_758895.1</u>
42	33669 - 30316	3354	-	Proteína de replicación RepA putativa, ORF 04 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína hipotética, ORF 03 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ] Proteína hipotética, ORF 05 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	0,0 9,00E-32 4,00E-20	828/860 (96%) 68/69 (98%) 52/53 (98%)	<u>NP_758897.1</u> <u>NP_758896.1</u> <u>NP_758898.1</u>

				Proteína de replicación RepA, gp37 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ]	2,00E-15	147/672 (21%)	<u>gbAAC48876.1</u>
				Proteína de replicación putativa RepA, gp57 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	2,00E-14	51/201 (25%)	<u>YP_001039868.1</u>
				Proteína de replicación RepA, gp35 [Fago phiKO2 <i>Klebsiella oxytoca</i> ]	3,00E-14	147/675 (21%)	<u>YP_006615.1</u>
				Proteína de replicación RepA, gp36 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas</i> ]	1,00E-13	139/640 (21%)	<u>YP_001686772.1</u>
				Proteína de replicación RepA, gp36 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ]	4,00E-10	84/343 (24%)	<u>NP_892081.1</u>
43	34662 - 33985	840	-	Represor putativo de fagos, ORF 06 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	3,00E-99	189/230 (82%)	<u>NP_758999.1</u>
				Proteína represor putativa, gp59 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	1,00E-41	91/206 (44%)	<u>YP_001039870.1</u>
44	34684 - 35385	702	+	Proteína hipotética, ORF 07 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	5,00E-136	233/233 (100%)	<u>NP_758900.1</u>
				Proteína hipotética, gp60 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	3,00E-49	97/187 (51%)	<u>YP_001039871.1</u>
				Antirepresor de profagos putativo, gp38 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	2,00E-29	73/193 (37%)	<u>YP_001686774.1</u>
				Represor, gp41 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ]	3,00E-15	59/182 (32%)	<u>NP_892087.1</u>
45	35538 - 35804	267	+	Proteína hipotética, ORF 08 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	3,00E-36	74/75 (98%)	<u>NP_758901.1</u>
				Proteína de transferencia conjugativa, gp61 [VP 882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	0.012	26/65 (40%)	<u>YP_001039872.1</u>
46	35912 - 36382	471	+	Proteína hipotética, ORF 09 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	9,00E-85	155/156 (99%)	<u>NP_758902.1</u>
				Proteína de recombinación putativa, ORF 10 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-179	307/309 (99%)	<u>NP_758903.1</u>
47	36416 - 37345	930	+	Proteína asociada a recombinación RdgC [ <i>Vibrio fischeri</i> MJ11]	1,00E-66	118/305 (38%)	<u>YP_002156820.1</u>
				Proteína hipotética, ORF 12 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-60	112/112 (100%)	<u>NP_758905.1</u>
48	37400 - 37969	570	+	Proteína hipotética, ORF 11 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-57	108/113 (95%)	<u>NP_758904.1</u>
				Proteína hipotética, ORF 13 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-31	66/67 (98%)	<u>NP_758906.1</u>

49	37966 - 38385	420	+	Proteína hipotética VPV882_gp65 [ Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína hipotética QD1 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ] Proteína hipotética gp43 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ] Proteína hipotética gp43 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	4,00E-32 2,00E-04 3,00E-04 4,00E-04	65/132 (49%) 24/70 (34%) 20/60 (33%) 31/97 (31%)	YP_001039876.1 gbAAB81659.1 NP_892089.1 YP_001686779.1
50	38385 - 38975	591	+	Proteína hipotética, ORF 14 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	7,00E-107	192/196 (97%)	NP_758907.1
51	38981 - 39142	162	+	Proteína hipotética, ORF 15 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-21	53/53 (100%)	NP_758908.1
52	39115 - 39333	219	+	Proteína hipotética Pput_4147 [ <i>Pseudomonas putida</i> F1]	9,00E-17	43/64 (67%)	YP_001269455.1
53	39749 - 40240	492	+	Adenin - metiltransferasa putativa, ORF 17 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	8,00E-88	154/157 (98%)	NP_758910.1
				DNA - Adenin metilasa putativa gp55 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ]	1,00E-49	88/147 (59%)	NP_892105.1
				DNA - Adenin metilasa putativa, gp52 [Fago phiKO2 <i>Klebsiella oxytoca</i> ]	2,00E-48	84/144 (58%)	YP_006632.1
				Adenin metilasa específica, gp52 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ]	1,00E-22	50/82 (60%)	NP_046948.1
54	40161 - 40811	651	+	Adenin metiltransferasa putativa, ORF 17 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	2,00E-114	196/196 (100%)	NP_758910.1
				DNA - Adenin metilasa putativa, gp52 [Fago phiKO2 <i>Klebsiella oxytoca</i> ]	2,00E-54	103/189 (54%)	YP_006632.1
				DNA - Adenin metilasa putativa gp55 [Fago PY54 <i>Yersinia enterocolitica</i> ]	6,00E-54	104/195 (53%)	NP_892105.1
				Adenin metilasa específica putativa, gp52 [Fago N15 <i>Escherichia coli</i> ]	3,00E-47	91/195 (46%)	NP_046948.1
55	40895 - 41164	270	+	P Proteína hipotética, ORF 18 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	9,00E-43	89/89 (100%)	NP_758911.1
				Proteína hipotética, gp69 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	4,00E-23	60/85 (70%)	YP_001039880.1
56	41161 - 41718	558	+	P Proteína hipotética, ORF 19 [Fago VHML <i>Vibrio harveyi</i> ]	1,00E-105	184/185 (99%)	NP_758912.1
				Proteína hipotética, gp70 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ]	5,00E-72	128/180 (71%)	YP_001039881.1



					Proteína hipotética, gp45 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	6,00E-56	105/179 (58%)	<u>YP_001686781.1</u>
57	41734 - 42276	543	+		Proteína hipotética, ORF 20 [Fago VHML <i>Vibrio karveyi</i> ] Proteína hipotética, gp71 [Fago VP882 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ] Proteína hipotética, gp46 [Fago phiHAP-1 <i>Halomonas aquamarina</i> ]	1,00E-58 1,00E-44 1,00E-14	111/111 (100%) 93/170 (54%) 39/124 (31%)	<u>NP_758913.1</u> <u>YP_001039882.1</u> <u>YP_001686782.1</u>
58	42291 - 42584	294	+		Proteína Hipotética			

ANEXO 3: Cepas sensibles y resistentes a la infección con el fago.

Cepas analizadas	Cepas Sensibles	Obtención de cepas lisogenizadas	Origen	País	Año de aislamiento	Serotipo
<i>V. parahaemolyticus</i> pandémicos						
PMA37.5	+	-	Choritos Cultivo caleta La Arena	Chile	2005	O3:K6
PMC14.6	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2006	O3:K6
PMC68	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2004	O3:K6
PMC34	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2004	O3:K6
PMC6.8	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2008	O3:K6
PMC4.6	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2006	NR
PMC2.8	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2008	O3:K6
PMC10.6	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2006	O3:K6
PMC1.7	+	+	Hospital Puerto Montt	Chile	2007	O3:K6
PMC58.5-UVC	+	-	Laboratorio biotecnología, INTA.	Chile	2008	O3:K6
PMC61	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2004	NR
PMC41	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2004	NR
PMC52	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2004	NR
PMC15.5	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2005	NR

PMC41.5	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2005	NR
PMC56.5	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2005	NR
PMC2.5	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2005	NR
PMC10.5	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2005	NR
PMC2.6	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2006	O3:K6
PMC6.6	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2006	NR
PMC11.7	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2007	O3:K6, O3:K59
PMC50.7	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2007	O3:K6
PMC75.7	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2007	O1:KUT
PMC60.7	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2007	O1:KUT
PMC19.8	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2008	O3:K6
PMC22.8	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2008	O3:K6
PMC28.8	-	-	-	Hospital Puerto Montt	Chile	2008	O3:K6
<i>V. parahaemolyticus</i> No pandémicas							
PMA3.5	-	-	-	Pto Montt	Chile	2005	O4:KUT
PMA45.5	-	-	-	Choritos La Arena	Chile	2005	O3:K6
PMA112	-	-	-	Pto Montt	Chile	2004	O3:K6
PMA2.5	-	-	-	Choritos Quillaípe	Chile	2005	O4:KUT
PMA339	-	-	-	Pto Montt	Chile	2004	O4:KUT
PMA16.5	-	-	-	Pto Montt	Chile	2005	O4:K12
PMA337	-	-	-	Pto Montt	Chile	2004	O7:KUT
PMA189	-	-	-	Pto Montt	Chile	2004	O3:K6

PMA79	-	-	-	Pto Montt	Chile	2004	O2:KUT
PMA27.5	-	-	-	Choritos Quillaipe	Chile	2005	O6:K46
PMA19.5	-	-	-	Choritos Coihuin	Chile	2005	NR
PMA22.5	-	-	-	Choritos Coihuin	Chile	2005	NR
PMA1.5	-	-	-	Choritos La Arena	Chile	2005	O3:K6
PMA13.6	-	-	-	La Arena	Chile	2006	NR
PMA34.6	-	-	-	La Arena	Chile	2006	NR
PMA40.6	-	-	-	La Arena	Chile	2006	NR
PMA1.7	-	-	-	Pto Montt	Chile	2007	NR
PMA11.7	-	-	-	Pto Montt	Chile	2007	NR
PMA21.7	-	-	-	Pto Montt	Chile	2007	NR
CH1055	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1997	O3:KUT
CH1314	-	-	-	Camarones	Alemania	1998	O1:K33
CH1315	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1998	O6:K46
CH1385	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1999	O1:KUT
CH1386	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1999	O8:K41
CH1387	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1999	O8:KUT
CH1405	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1999	O10:KUT
CH1460	-	-	-	Agua de mar	Alemania	1999	O10:KUT
CH1443	-	-	-	Agua de mar	Alemania	1999	O11:KUT
CH1538	-	-	-	Agua de mar	Alemania	1999	O4:K34
CH465	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O2:K28
CH464	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O2:K28

CH463	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O1:KUT
CH462	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O1:KUT
CH460	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O1:K64
CH459	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O1:KUT
CH445	-	-	-	Camarones	Alemania	1995	O8:KUT
CH439	-	-	-	Camarones	Alemania	1995	O2:K3
CH1536	-	-	-	Agua de mar	Alemania	1999	O4:K34
CH1534	-	-	-	Agua de mar	Alemania	1999	O3:K53
CH1473	-	-	-	Heces humanas	Alemania	1996	O1:K33
CH470	-	-	-	Neumünster	Alemania	1996	O3:K37
CH467	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O5:KUT
CH466	-	-	-	Camarones	Alemania	1996	O2:K28
CH443	-	-	-	Camarones	Alemania	1995	O4:K46
CH442	-	-	-	Camarones	Alemania	1995	O3:KUT
CH441	-	-	-	Camarones	Alemania	1995	O1:KUT
CH437	-	-	-	Bremenhaven	Alemania	1995	O1:KUT
<i>Vibrio</i> spp.							
<i>V. cholerae</i> Vc3	-	-	-	ND	ND	ND	NR
<i>V. alginolyticus</i> CH454	-	-	-	Camarones	Alemania	ND	NR
<i>V. alginolyticus</i> CH451	-	-	-	Camarones	Alemania	ND	NR
<i>V. alginolyticus</i> CH446	-	-	-	Camarones	Alemania	ND	NR
<i>V. alginolyticus</i> Va2	-	-	-	ND	ND	ND	NR
<i>V. alginolyticus</i> Va3	-	-	-	ND	ND	ND	NR

<i>V. vulnificus</i> CH444	-	-	Camarones	Alemania	ND	O:4
<i>V. vulnificus</i> CH472	-	-	Agua de mar	Alemania	ND	O:8
<i>V. harveyi</i> DSM2332	-	-	ND	Alemania	ND	NR
<i>V. harveyi</i> DSM6904	-	-	ND	Alemania	ND	NR
<i>V. anguillarum</i> CH492	-	-	Agua de mar	Alemania	ND	NR
<i>V. anguillarum</i> CH491	-	-	Agua de mar	Alemania	ND	NR
<i>V. mimicus</i> CH386	-	--	Agua de mar	Alemania	ND	O:24
<i>V. cincinnatiensis</i> CH1271	-	-	Toro	Alemania	ND	NR
<i>V. metschnikovii</i> CH419	-	-	Pato	Alemania	ND	NR

\*: Cepas lisogenizadas que contienen el profago de 42 Kbp, no forman placas de lisis al ser infectadas y son inducidas por mitomicina C. (-) indica cepas no infectadas, (+) indica cepas sensibles o en su caso cepas de las cuales se obtuvieron resistentes lisogenizadas después de infección.

NR: No Realizado

ND: No definido

## Enhancement of UV Light Sensitivity of a *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Pandemic Strain Due to Natural Lysogenization by a Telomeric Phage<sup>†</sup>

Beatriz Zabala, Katherine García, and Romilio T. Espejo\*

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul, Santiago, Chile 6903625

Received 27 August 2008/Accepted 8 January 2009

The *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clonal strain was first observed in southern Chile in 2004 and has since caused approximately 8,000 seafood-related diarrhea cases in this region. The massive proliferation of the original clonal population offers a unique opportunity to study the evolution of a bacterial pathogen in its natural environment by detection and characterization of emerging bacterial variants. Here, we describe a group of pandemic variants characterized by the presence of a 42-kb extrachromosomal DNA that can be recovered by alkaline extraction. Upon treatment with mitomycin C, these variants lyse with production of a myovirus containing DNA of equal size to the plasmid but which cannot be recovered by alkaline extraction. Plasmid and phage DNAs show similar restriction patterns corresponding to enzyme sites in a circular permutation. Sequenced regions showed 81 to 99% nucleotide similarity to bacteriophage VHML of *Vibrio harveyi*. Altogether these observations indicate that the 42-kb plasmid corresponds to a prophage, consisting of a linear DNA with terminal hairpins of a telomeric temperate phage with a linear genome. Bacteria containing the prophage were 7 to 15 times more sensitive to UV radiation, likely due to phage induction by UV irradiation as plasmid curing restored the original sensitivity. The enhanced UV sensitivity could have a significant role in reducing the survival and propagation capability of the *V. parahaemolyticus* pandemic strain in the ocean.

*Vibrio parahaemolyticus*, a diverse bacterial species that inhabits coastal waters, includes strains associated with seafood-borne gastroenteritis (1, 7–9, 11, 14). Since 1996, many infections worldwide have been associated with isolates of a serovar O3:K6 group belonging to a clonal complex originally observed in Southeast Asia (28), now called the *V. parahaemolyticus* O3:K6 serovar pandemic clone (11, 22, 28, 37). The massive and rapid expansion of this clone has resulted in the clone diversity and the emergence of identifiable variants. At least 21 serovariants have been identified thus far (3, 5; also reviewed in reference 24). Other variants have been reported with minor differences in their restriction fragment length polymorphism-pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) or arbitrarily primed PCR patterns (5, 29); lack of *orf8* (5), which is characteristic of the pandemic clone (25); and presence of plasmids of different sizes (21). However, the method with the highest resolution to distinguish variants seems to be multiple locus analysis of variable-number tandem repeats, which allowed the differentiation of each of the 28 isolates belonging to the pandemic clone (20). In spite of these observations, the genome of the pandemic strain seems to be very conserved; of 4,832 open reading frames (ORFs) found in *V. parahaemolyticus* strain RIMD2210633, which was isolated in 1996, all except 10 or fewer were found to be absent in two pandemic strains isolated in 2001 and compared by microarray (17). The *V. parahaemolyticus* pandemic clone was

first detected in the region of Puerto Montt in southern Chile in 2004, where it has proliferated and caused approximately 8,000 clinical cases since that year (6, 11, 12). This rapid and massive proliferation of the clonal pandemic population in Chile offers a unique opportunity to study the evolution of a bacterial pathogen in its natural environment by detection and characterization of emerging bacterial variants. Here, we describe *V. parahaemolyticus* pandemic clone variants that contain a 42-kb extrachromosomal element corresponding to a linear plasmid prophage that enhances sensitivity to UV light and likely impairs their survival in the ocean. The increased sensitivity is probably due to phage replication induction, which may have an important role in bacterial mortality in coastal waters (36). The prophage found in the pandemic strain variants is closely related to the bacteriophage VHML of *Vibrio harveyi* (26) and VP882 of *V. parahaemolyticus* (unpublished data) (sequence accession number EF057797), and it likely corresponds to a new group of temperate phages with a linear genome with cohesive ends and prophages consisting of linear plasmids with terminal hairpins (i.e., telomeres). This group includes phages  $\Phi$ HAP-1 of the marine *Halomonas aquamarina* (23), N15 of *Escherichia coli* (33), PY54 of *Yersinia enterocolitica* (15), and pKO2 of *Klebsiella oxytoca* (4, 15, 33).

### MATERIALS AND METHODS

**Strains, growth, and characterization.** Bacterial strains, except those from the summer of 2008, have been previously described (10–12). Thirteen pandemic *V. parahaemolyticus* strains isolated in 2008 were included in this study: eight clinical isolates and five isolates from shellfish. Isolation growth and characterization were performed as previously described (10).

**DNA analysis.** Presence or absence of the 42-kb plasmid was assessed by two methods: PFGE and alkaline DNA extraction. PFGE was performed as de-

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Líbano 5524, Macul, Santiago, Chile 6903625. Phone: 56 2 978 1426. Fax: 56 2 221 4030. E-mail: respejo@inta.cl.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 16 January 2009.

TABLE 1. Primers for PCR amplification of ORFs found in VHML and in clones of the 42-kb plasmid

Primer	Sequence
VHML ORF 1f	.....GGCGAACACATCAAGGAACT
VHML ORF 1r	.....TTCCACCTTGGAAATCAAGC
VHML ORF 23f	.....CAAAGGGGGTATTCGTTTCA
VHML ORF 23r	.....CCGACAGAACTGGTGAATGA
VHML ORF 24f	.....CGGTGATTACAAAGCGGATT
VHML ORF 24r	.....CGGGTCAGTGGTATGTTTT
VHML ORF 30f	.....TATGCAGGGGCTCCAAATAG
VHML ORF 30r	.....ATTTTTGCGGCAGTCACATC
VHML ORF 34f	.....CTTTGGCGACATGGCTTAC
VHML ORF 34r	.....GCTTCCATAACTCCGCATC
VHML ORF 39f	.....AATACCTACACGGCGCAGAA
VHML ORF 39r	.....GAAGGCGGCTGGATAATATG
VHML ORF 40f	.....AATCCGAGCAATGAACCTGT
VHML ORF 40r	.....CCCGGTCGGATTTTTAGTCT
VHML ORF 52f	.....AGCATTGTTCCACTCGCTC
VHML ORF 52r	.....GGCCGCAAACCTGGTTATTTA
42-kb Seq 37f	.....CTTAAAGTGGGGGCTCGAT
42-kb Seq 37r	.....GCCTATTCCTCCAGCCTTA
42-kb Seq 22f	.....GCCTATTCCTCCAGCCTTA
42-kb Seq 22r	.....AGCATTGGCGAGATTCATC

scribed previously (13), except that digestion with restriction enzymes was omitted. DNA alkaline extraction was performed using a Plasmid Mini Kit 1 (Omega Bio Tek, GA). Direct genome restriction analysis (DGREA) was performed as described previously (11). The presence or absence of the 42-kb plasmid DNA from different isolates was determined based on the restriction pattern from digestion with *Hae*III (Promega, WI), performed as described by the manufacturer. Analysis of the presence or absence of the 42-kb plasmid in the prototype strain of other DGREA groups of *V. parahaemolyticus* was performed by PCR amplification using primers for ORF 1, ORF 24, and ORF 34 of VHML. Viral DNA was prepared from cell lysates obtained after mitomycin C induction at 30 ng/ml, as described previously (26). After centrifugation at 5,000 × *g* for 10 min, the supernatant was passed through a 0.2- $\mu$ m-pore-size filter, and the filtrate was centrifuged at 140,000 × *g* for 50 min in a rotor 55.2 Ti ultracentrifuge (Beckman, CA). The pellet was suspended in synthetic seawater (23.4 g/liter NaCl, 24.7 g/liter MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g/liter KCl, and 1.43 g/liter CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, pH 6.5; 100  $\mu$ l per 40 ml of lysate) and then incubated with DNase (2  $\mu$ g/ml) and RNase (100  $\mu$ g/ml) for 2 h at 37°C. For DNA extraction, the phage particle suspension was treated with 500  $\mu$ g/ml proteinase K for 15 min at 37°C, sodium dodecyl sulfate was added at a final concentration of 0.5% (wt/vol), and the solution was incubated for 45 min at 65°C to break down the phage coat. The solution was then extracted twice with phenol-chloroform. Finally, the DNA was precipitated by adding 1/10 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and 2 volumes of absolute ethanol at -20°C. After the pellet was washed with 70% ethanol, it was dissolved in TE buffer (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 7.5).

**Cloning, PCR amplification, and sequencing.** Cloning was performed with a TOPO Shotgun Subcloning Kit (Invitrogen) using the 42-kb extrachromosomal DNA obtained after alkaline DNA extraction. Clones were sequenced by Macrogen (Seoul, Korea) using M13 forward and reverse primers. PCR amplification of VHML genes was performed with the primers listed in Table 1, which were designed according to the published sequence for this phage (26). For the amplification reactions, approximately 10 ng of bacterial DNA was incubated with a 0.2 mM concentration of each deoxynucleotide triphosphate, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.05 U/ $\mu$ l of *Taq* polymerase. The thermal cycling consisted of one cycle of 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification at 94°C, 60°C, and 72°C for 1 min each and a final cycle of 72°C for 5 min. Amplicons were directly sequenced by Macrogen using forward and reverse primers.

**UV irradiation.** For UV induction, 50 ml of exponentially growing bacteria at an *A*<sub>600</sub> of 0.2 was irradiated in a petri dish under mild reciprocal shaking with a 310-nm wavelength 6-W lamp for 12.5 min at a distance of 25 cm inside a biological safety cabinet. Specific death rates were calculated from survival curves obtained after UV irradiation under the same conditions, except that cells were diluted to 10<sup>4</sup> CFU/ml in synthetic seawater. Intensity of the UV radiation in the petri dish was 0.18 W/m<sup>2</sup>, as measured with a iodide/iodate actinometer as previously described (32). The same conditions were used for solar irradiation, except that the culture was exposed at midday in an open environment. To avoid contamination, an ascending filtered airflow was maintained during irradiation.

Water that evaporated during irradiation, assessed based on the decrease in volume observed on the dish walls, was replaced with distilled water. The number of CFU was determined by plating in soft agar by a modified pour-plate method (2): 1 ml of the appropriate dilution was mixed with 9 ml of LB medium with 3% NaCl and 1.5% agar at 45°C and immediately poured in a petri dish. Once hardened, the agar was covered with 10 ml of LB medium with 3% NaCl and 1.5% agar at 45°C so that nonsubmerged bacteria could not spread on the surface of the agar. Once the top agar had hardened, plates were incubated overnight at 37°C.

**Other procedures.** Induction with mitomycin C was performed as described previously (26). Curing of the 42-kb plasmid was performed by growing the cells in LB medium with 3% NaCl containing 150  $\mu$ g/ml of acrydine orange (Merck) as described previously (19); 10 colonies were subjected to PCR analysis for five plasmid genes (proteolomerase, capsid protein, portal protein, tail contractile sheath protein, and baseplate spike protein), and two genes were found to lack the plasmid. Cured cells were also obtained by analysis of surviving bacteria after UV irradiation at a 0.05% survival. Electron microscopy was performed using the lysates of mitomycin C-induced bacteria after elimination of cell debris by centrifugation at 10,000 × *g* for 10 min and filtration through 0.2- $\mu$ m-pore-size filters. After sample deposition on pioloform-carbon-coated 400-mesh copper grids, staining was performed with 2% aqueous uranyl acetate in HEPES buffer. Samples were then analyzed using a JEM-1010 transmission electron microscope (JOEL, Tokyo, Japan) at 80 kV.

Restriction site mapping was performed by digestion with restriction enzymes *Nhe*I, *Hind*III, and *Sph*I from New England Biolabs (Massachusetts), according to the manufacturer's instructions. Samples were electrophoresed on a 0.4% agarose gel (Winkler) for 15 h at 20 V using a high-molecular-weight DNA marker (Invitrogen, CA) to distinguish fragments larger than 10 kb and on a 1% agarose gel for 2 h at 70 V using the GeneRuler 1-kb DNA ladder (Fermentas) as a marker for fragments of less than 10 kb.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences of the phage genes have been deposited at GenBank under accession numbers EU647248 to EU647255.

## RESULTS

Analysis of 112 strains of *V. parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clonal complex obtained from clinical and shellfish samples during the Puerto Montt outbreaks each summer between 2004 and 2008 revealed the emergence of variants containing a 42-kb extrachromosomal DNA in 2005. This DNA was detected after both PFGE of bacterial DNA (Fig. 1A) and conventional agarose gel electrophoresis of DNA extracted by alkaline lysis (Fig. 1B). Strains from Southeast Asia and the initial outbreaks in Antofagasta in 1998 lacked this plasmid. The percentage of bacterial isolates containing the prophage increased from 23% in 2005 to 33% in 2006 decreased to an undetectable level in 2007 but reappeared in 2008 (Table 2).

Restriction fragment length polymorphism analysis (with *Hae*III) of the plasmid from different isolates showed identical patterns in every isolate analyzed (data not shown). Five clones obtained by random cloning of the 42-kb DNA extracted from the chosen prototype isolate (PMC 58.5) were sequenced, and the insert sequences revealed 81 to 99% sequence similarity with VHML, a phage found in *V. harveyi* (26). PCR amplification with primers designed according to the VHML nucleotide sequence revealed the presence of five key putative genes of VHML encoding proteolomerase, capsid protein, portal protein, tail contractile sheath protein, and baseplate spike protein. Sequencing of three of these amplicons showed 93 to 98% similarity with the corresponding VHML genes (Table 3).

Mitomycin C treatment of strains that contained the 42-kb plasmid resulted in cell lysis within 1 h after treatment and the production of phage particles showing the morphology of myoviruses: 60-nm icosahedral heads with a straight tail 160 nm long and 6 nm wide, enclosed by an apparent sheath 15 nm wide (Fig. 2). The amount of 42-kb DNA recovered from the



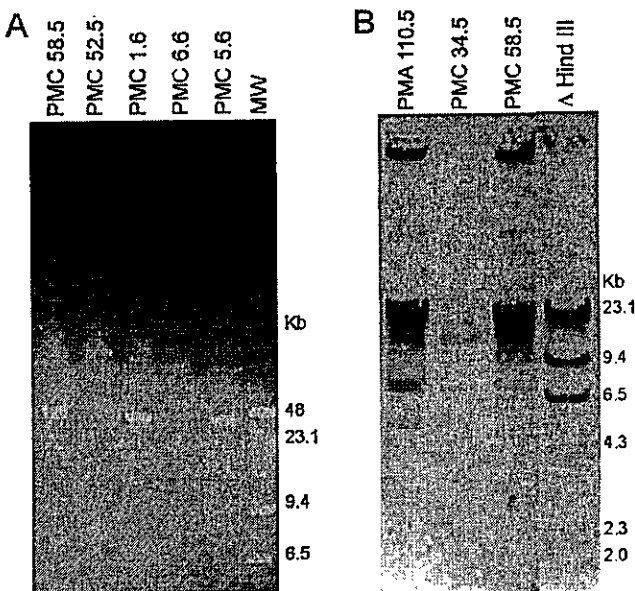


FIG. 1. Detection of extrachromosomal DNA in strains of the O3:K6 pandemic clonal complex isolated in Chile. (A) PFGE of bacterial DNA from strains with (PMCs 58.5, 1.6, and 5.6) and without (PMCs 52.5 and 6.6) the extrachromosomal DNA. Lane MW,  $\lambda$  DNA and  $\lambda$  HindIII DNA molecular weight markers. (B) Gel electrophoresis of DNA extracted after alkaline hydrolysis from strains with (PMCs 110.5 and 58.5) and without (PMC 34.5) the extrachromosomal DNA. Lane  $\lambda$  HindIII,  $\lambda$  HindIII DNA molecular weight marker.

induced lysate particles corresponded to approximately 200 phages per cell, or 20 to 100 times the amount of plasmid DNA observed after PFGE or alkaline DNA extraction in noninduced cells. Infective phages (up to  $10^9$  PFU/ml) were observed upon infection with the mitomycin C lysate in some but not all pandemic isolates lacking the 42-kb plasmid. Plaque-forming units were also observed in plasmid-cured PMC 58.5 strains (see below). Resistant clones that appeared after infection contained the 42-kb plasmid when examined by DNA alkaline extraction (results not shown). Altogether these observations show that the 42-kb plasmid corresponds to a temperate phage with a plasmid prophage.

The presence of a putative protelomerase gene suggested that the prophage could consist of a linear DNA with covalently closed terminal hairpin ends instead of a closed circu-

TABLE 3. Similarity of the 42-kb extrachromosomal DNA with bacteriophage VHML

Clone or PCR amplicon	ORF(s) in VHML	Putative function	Identity (no. of identical residues/total no. of residues [%])
58p10-8b	37	Transposase	291/355 (81)
58p10-8d	53	Unknown	217/236 (92)
58p10-9	10	Recombination protein	480/482 (99)
58p10-11h	4	DNA primase	581/629 (92)
58p10-12f	21, 22	Terminase small and large subunits	584/602 (97)
Amplicon 1	1	Protelomerase	508/542 (93)
Amplicon 2	24	Capsid protein	549/559 (98)
Amplicon 3	34	Tail fiber protein	283/297 (95)

lar DNA, as originally assumed because of the recovery of the plasmid after alkaline lysis. Terminal hairpins ends (telomeres) are observed in the prophages of the telomeric temperate phage group (33). These linear plasmids are recovered upon extraction with plasmid purification kits based on alkaline denaturation as the telomeres join the complementary strands and allow rapid renaturation after alkaline denaturation, which occurs with circular closed DNA. The failure to recover the phage DNA after alkaline lysis occurs because the encapsulated DNA of the telomeric phage group is a linear molecule that lacks telomeric ends. Genes in phage and plasmid DNA are circularly permuted. Restriction site mapping of both phage and prophage DNA with NheI, HindIII, and SphI showed the linear nature and circular permutation of the pandemic *V. parahaemolyticus* plasmid and phage DNA. The schematic shown in Fig. 3 is predicted if both linear DNAs are generated from a common circular molecule by a single cut at the indicated positions, a replication mechanism observed with telomeric phages (33).

UV light irradiation may induce prophage replication, resulting in bacterial lysis. Like mitomycin C, UV irradiation of PMC 58.5 cultures as described in Materials and Methods induced lysis and phage particle production within 1 h (data not shown). In view of these results, we explored the possibility that the presence of the inducible prophage might increase the sensitivity of *V. parahaemolyticus* pandemic strains to UV light and solar radiation. Survival curves of *V. parahaemolyticus* pan-

TABLE 2. Presence of the 42-kb extrachromosomal DNA in *V. parahaemolyticus* strains of the pandemic clonal complex from clinical and shellfish samples

Origin	No. of isolates by sample type				Total for sample group (no. of isolates)		% Positive in sample group
	Clinical		Shellfish		Analyzed	Positive	
	Analyzed	Positive	Analyzed	Positive			
Southeast Asia	12	0	0	0	12	0	0
Antofagasta 1998	9	0	4	0	13	0	0
Puerto Montt 2004	9	0	4	0	13	0	0
Puerto Montt 2005	9	1	4	2	13	3	23
Puerto Montt 2006	11	6	10	1	21	7	33
Puerto Montt 2007	27	0	0	0	27	0	0
Puerto Montt 2008	8	2	5	0	13	2	15

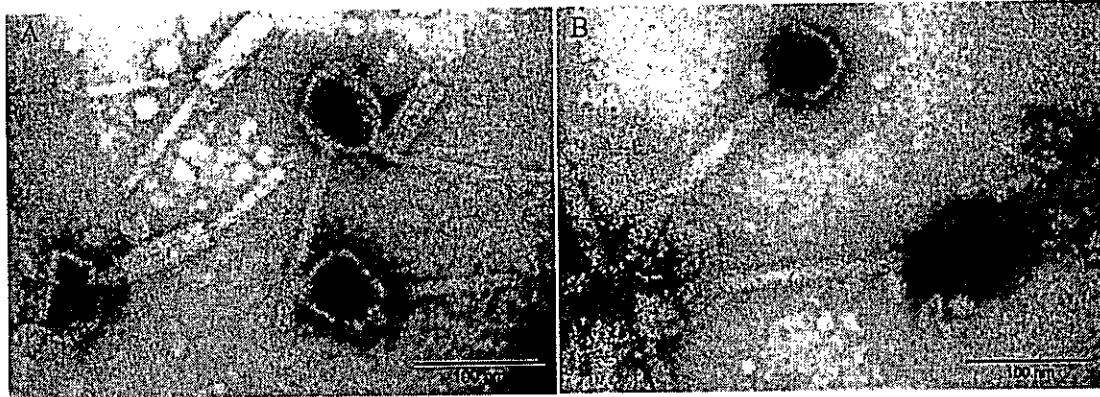


FIG. 2. Negative staining of phage particles observed after induction with mitomycin C of *V. parahaemolyticus* strain PMC 58.5.

demically obtained after UV irradiation either from a UV lamp or the sun showed a specific death rate 7 to 15 times higher in strains containing the 42-kb plasmid (Fig. 4). A single representative experiment is shown in Fig. 4A though several experiments were done in each case; the average specific death rates from four independent experiments were  $-0.175 \pm 0.029 \text{ min}^{-1}$  and  $0.027 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  for PMC 58.5 and PMA 37.5, respectively. Plasmid curing of PMC 58.5 by incubation with acrydine orange decreased the death rate to  $0.019 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$ . Also, survivors without the plasmid obtained after UV irradiation of PMC 58.5 showed a lower sensitivity with a death rate of  $0.014 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ . Bacteria maintained under irradiation conditions, but protected from UV with a 6-mm-thick glass plate, showed 100% survival. Specific death rates measured under solar irradiation in different experiments (Fig. 4B) could not be directly compared due to the inability to reproduce solar irradiation conditions; however, in every experiment

when the survival of PMA 37.5 was 10%, the survival of PMC 58.5 was between 0.2% and 1%.

The presence of the 42-kb plasmid appeared to be specific to the O3:K6 pandemic clonal group. We analyzed prototype strains from the other DGREA groups isolated in Chile by PCR amplification for three genes in the 42-kb plasmid, and no strain contained the plasmid (10; also E. Harth, L. Matsuda, C.

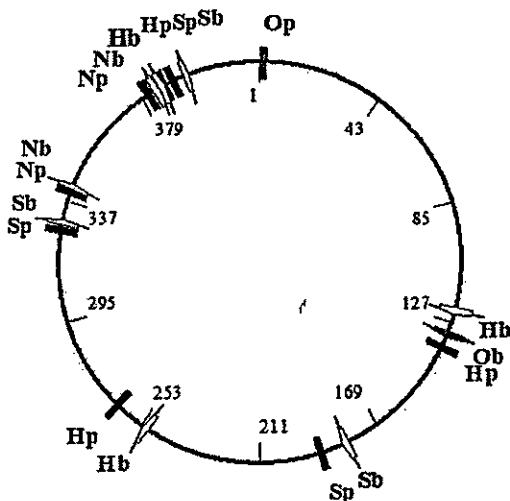


FIG. 3. Restriction maps of plasmid and bacteriophage DNA obtained from *V. parahaemolyticus* strain PMC 58.5. N, H, and S correspond to NheI, HindIII, and SphI restriction enzymes sites, respectively. A hypothetical circular map is shown in the middle, with the possible ends shown with a red arrow and the restriction sites with a black line. b, bacteriophage; p, plasmid.

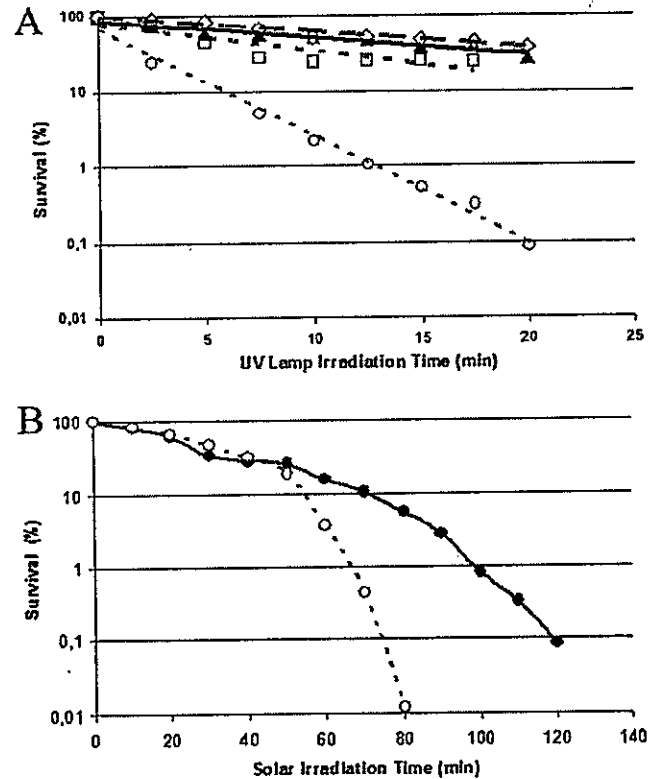


FIG. 4. Effect of irradiation from a 310-nm UV lamp (A) and from the sun (B) on the survival of strains of the O3:K6 pandemic clonal complex with and without the 42-kb DNA plasmid, PMC 58.5 (O) and PMA 37.5 (●), respectively. ◆, PMC 58.5 cured with acrydine orange; ◇, PMC 58.5 spontaneously cured after UV irradiation.

Hernández, M. L. Riosco, J. Romero, N. González-Escalona, and R. T. Espejo, submitted for publication).

## DISCUSSION

Our findings revealed the emergence of a variant from the pandemic *V. parahaemolyticus* O3:K6 clonal complex in its natural environment. This variant is characterized by the presence of a 42-kb plasmid. Mitomycin C and UV irradiation induction of infectious phage containing DNA with the same sequences of the plasmid indicates that the plasmid corresponds to a prophage. The different characteristics of prophage and phage DNA upon alkaline extraction and the circular permutation of restriction enzyme sites indicate that the prophage likely belongs to a group of temperate phages with a linear genome, with or without cohesive ends, whose prophages are linear plasmids with terminal hairpins (i.e., telomeres) (4, 15, 33). The presence of terminal hairpins (with covalent bonds between complementary strands) in the prophage would allow rapid renaturation after alkaline denaturation of the complementary strands, as it occurs with circular closed DNA. Linear phage DNA would not rapidly renature after denaturation and would not be recovered upon alkaline extraction.

The high sequence similarity of the 42-kb plasmid to bacteriophage VHML of *V. harveyi* also suggested that the 42-kb DNA was a prophage (26). Although VHML DNA contains putative genes characteristic of telomeric phages (23), the plasmidial nature of the prophage has not been shown; instead, integration of the prophage has been claimed (35). Unfortunately, VHML seems to have been lost (23), and we have been unable to obtain a starting culture for comparison in the detailed characterization of the 42-kb plasmid that is currently under way.

The absence of the 42-kb prophage in the examined South-east Asian and early Chilean strains suggests that this DNA was introduced in part of the pandemic clone population along the Chilean coast. It is unlikely that a single cell infected with the phage propagated more rapidly than uninfected cells to reach 33% of the population, as observed in 2006. Instead, it seems more likely that the temperate phage propagated in the pandemic clonal population. The presence of sensitive and resistant strains within the clonal pandemic population suggests that a resistant population may be being selected. This phage lyses most infected bacteria but also lysogenizes some bacteria that become resistant when challenged with the same phage (data not shown). Although we can only speculate on the observed increase and decrease in the number of isolates with the 42-kb prophage, this fluctuation could be associated with the interaction between host and virus and their mutual dependence, as postulated by Jensen et al. (18) for *V. cholerae*. This case, however, adds further complexity because of death by UV solar radiation of lysogenized cells. The presence of the 42-kb prophage has a notable effect on the sensitivity of the pandemic strain to UV irradiation, including solar UV irradiation, due to prophage induction and cell lysis. This phenomenon is not unprecedented as prophage activation is the major lethal factor in the highly UV-sensitive *Shewanella oneidensis* MR1 (31). Death of lysogenic cells by temperate phage induction is one mode of bacterial death due to infection by bacte-

riophages (16, 36) and a substantial cause of marine bacterial mortality (34). The importance of prophages in marine bacteria proliferation has been discussed in a recent review (30). A similar observation on the presence of a temperate prophage in a pathogenic strain of *V. parahaemolyticus* (WP1) and its potential association with higher sensitivity to UV radiation was reported 18 years ago (27). Infection by the phage and the higher sensitivity of lysogenized pandemic strains to solar radiation shown here may have critical consequences on the persistence and propagation of the strain in open seawater and could be one cause for the apparent changes in the bacterial load of pandemic *V. parahaemolyticus* strains in seafood associated with diarrhea outbreaks.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stefan Hertwig for helpful comments on the manuscript and Jochen Reetz for electron microscopy of phage particles (both from the Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany). We also thank Natalia Peñaloza and Rafael Torres for performing the inactivation curves and measurement of UV fluence.

B. Zabala and K. García acknowledge scholarships from Deutscher Akademischer Austausch Dienst and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, respectively. This work was supported in part by a grant from FONDECYT (no. 1070658).

## REFERENCES

1. Alam, M. J., S. Miyoshi, and S. Shinoda. 2003. Studies on pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* during a warm weather season in the Seto Inland Sea, Japan. *Environ. Microbiol.* 5:706–710.
2. Berney, M., H. U. Weilenmann, J. Ihssen, C. Bassin, and T. Egli. 2006. Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2586–2593.
3. Bhuiyan, N. A., M. Ansaruzzaman, M. Kamruzzaman, K. Alam, N. R. Chowdhury, M. Nishibuchi, S. M. Faruque, D. A. Sack, Y. Takeda, and G. B. Nair. 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.
4. Casjens, S. R., E. B. Gilcrease, W. M. Huang, K. L. Bunny, M. L. Pedulla, M. E. Ford, J. M. Houtz, G. F. Hatfull, and R. W. Hendrix. 2004. The pKO2 linear plasmid prophage of *Klebsiella oxytoca*. *J. Bacteriol.* 186:1818–1832.
5. Chowdhury, A., M. Ishibashi, V. D. Thiem, D. T. N. Tuyet, T. Van Tung, B. T. Chien, L. von Seidlein, D. G. Canb, J. Clemens, D. D. Trach, and M. Nishibuchi. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48:319–327.
6. Cordova, J. L., J. Astorga, W. Silva, and C. Riquelme. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997–1998 Chilean outbreak. *Biol. Res.* 35:433–440.
7. DePaola, A., C. A. Kaysner, J. Bowers, and D. W. Cook. 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.
8. DePaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook. 2003. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1521–1526.
9. DePaola, A., J. Ulaszek, C. A. Kaysner, B. J. Tenge, J. L. Nordstrom, J. Wells, N. Pahr, and S. M. Gendel. 2003. Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3999–4005.
10. Fuenzalida, L., L. Armijo, B. Zabala, C. Hernandez, M. L. Riosco, C. Riquelme, and R. T. Espejo. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117:270–275.
11. Fuenzalida, L., C. Hernandez, J. Toro, M. L. Riosco, J. Romero, and R. T. Espejo. 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ. Microbiol.* 8:675–683.
12. Gonzalez-Escalona, N., V. Cachicas, C. Acevedo, M. L. Riosco, J. A. Vergara, F. Cabello, J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11:129–131.
13. Gonzalez-Escalona, N., J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. Polymorphism and gene conversion of the 16S rRNA genes in the multiple rRNA operons of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 246:213–219.

14. Hara-Kudo, Y., K. Sugiyama, M. Nishibuchi, A. Chowdhury, J. Yatsuyanagi, Y. Ohtomo, A. Saito, H. Nagano, T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, M. Miyahara, and S. Kumagal. 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.
15. Hertzog, S., I. Klein, V. Schmidt, S. Beck, J. A. Hammerl, and B. Appel. 2003. Sequence analysis of the genome of the temperate *Yersinia enterocolitica* phage PY54. *J. Mol. Biol.* 331:605-622.
16. Hewson, L., and J. A. Fuhrman. 2007. Characterization of lysogens in bacterioplankton assemblages of the southern California borderland. *Microb. Ecol.* 53:631-638.
17. Izutsu, K., K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda, and T. Iida. 2008. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect. Immun.* 76:1016-1023.
18. Jensen, M. A., S. M. Faruque, J. J. Mekalanos, and B. R. Levin. 2006. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4652-4657.
19. Keyhani, J., E. Keyhani, F. Attar, and A. Haddadi. 2006. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33:238-242.
20. Kimura, B., Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, and T. Fujii. 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J. Microbiol. Methods* 72:313-320.
21. Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, A. Depaola, M. Ishibashi, K. Shimada, M. Nishibuchi, and E. Liebana. 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.
22. Matsumoto, C., J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, and M. Nishibuchi. 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.
23. Moberley, J. M., R. N. Authement, A. M. Segall, and J. H. Paul. 2008. The temperate marine phage PhiHAP-1 of *Halomonas aquamarina* possesses a linear plasmid-like prophage genome. *J. Virol.* 82:6618-6630.
24. Nair, G. B., T. Rammamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, and D. A. Sack. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:39-48.
25. Nasu, H., T. Iida, T. Sugahara, Y. Yamachi, K. S. Park, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Honda. 2000. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:2156-2161.
26. Oakey, H. J., B. R. Cullen, and L. Owens. 2002. The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. *J. Appl. Microbiol.* 93:1089-1098.
27. Ohnishi, T., and K. Nozu. 1986. Induction of phage-like particles from a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* by mitomycin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141:1249-1253.
28. Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 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.
29. Okura, M., R. Osawa, A. Iguchi, E. Arakawa, J. Terajima, and H. Watanabe. 2003. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41:4676-4682.
30. 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.
31. Qiu, X., J. M. Tiedje, and G. W. Sundin. 2005. Genome-wide examination of the natural solar radiation response in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Photochem. Photobiol.* 81:1559-1568.
32. Rahn, R. O., J. Bolton, and M. I. Stefan. 2006. The iodide/iodate actinometer in UV disinfection: determination of the fluence rate distribution in UV reactors. *Photochem. Photobiol.* 82:611-615.
33. Rybchin, V. N., and A. N. Svarchevsky. 1999. The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* 33:895-903.
34. Suttle, C. A. 2007. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:801-812.
35. Vidgen, M., J. Carson, M. Higgins, and L. Owens. 2006. Changes to the phenotypic profile of *Vibrio harveyi* when infected with the *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML)-bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 100:481-487.
36. Weinbauer, M. G., and C. A. Suttle. 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.
37. Wong, H. C., S. H. Liu, T. K. Wang, C. L. Lee, C. S. Chiou, D. P. Liu, M. Nishibuchi, and B. K. Lee. 2000. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3981-3986.

## The Linear Plasmid Prophage Vp58.5 of *Vibrio parahaemolyticus* Is Closely Related to the Integrating Phage VHML and Constitutes a New Incompatibility Group of Telomere Phages<sup>†</sup>

Beatriz Zabala,<sup>2</sup>† Jens A. Hammerl,<sup>1</sup>† Romilio T. Espejo,<sup>2</sup> and Stefan Hertwig<sup>1\*</sup>

Bundesinstitut für Risikobewertung, Diederdsdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany,<sup>1</sup> and Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, El Libano 5524, Macul, Santiago 6903625, Chile<sup>2</sup>

Received 1 April 2009/Accepted 2 July 2009

*Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strains recovered in Chile frequently possess a 42-kb plasmid which is the prophage of a myovirus. We studied the prototype phage VP58.5 and show that it does not integrate into the host cell chromosome but replicates as a linear plasmid (Vp58.5) with covalently closed ends (telomeres). The Vp58.5 replicon coexists with other plasmid prophages (N15, PY54, and  $\Phi$ KO2) in the same cell and thus belongs to a new incompatibility group of telomere phages. We determined the complete nucleotide sequence (42,612 nucleotides) of the VP58.5 phage DNA and compared it with that of the plasmid prophage. The two molecules share the same nucleotide sequence but are 35% circularly permuted to each other. In contrast to the hairpin ends of the plasmid, VP58.5 phage DNA contains 5'-protruding ends. The VP58.5 sequence is 92% identical to the sequence of phage VHML, which was reported to integrate into the host chromosome. However, the gene order and termini of the phage DNAs are different. The VHML genome exhibits the same gene order as does the Vp58.5 plasmid. VHML phage DNA has been reported to contain terminal inverted repeats. This repetitive sequence is similar to the telomere resolution site (*telRL*) of VP58.5 which, after processing by the phage protelomerase, forms the hairpin ends of the Vp58.5 prophage. It is discussed why these closely related phages may be so different in terms of their genome ends and their lifestyle.

Most temperate bacteriophages integrate into the host chromosome during lysogeny. However, there are some phages (telomere phages) whose prophages are linear plasmids with covalently closed ends. Members of this group of phages are the siphoviruses N15, PY54, and  $\Phi$ KO2 isolated from *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Klebsiella oxytoca*, respectively, and the recently described myoviruses  $\Phi$ HAP-1 of *Halomonas aquamarina* and VP882 of *Vibrio parahaemolyticus* (6, 20, 23, 26, 37). Despite their different origins (enterobacteria versus marine bacterium) and morphologies, all known telomere phages share similar genome organizations and some protein similarities. The linear DNA of each phage is a circular permutation of the respective linear plasmid prophage. For the generation of the terminal hairpins of the linear plasmid, the protelomerase (Tel) is essential (8). This enzyme has cleaving/joining activity; its target is a large palindromic DNA sequence called the telomere resolution site (*telRL*) located upstream of *tel* on the phage genome. After cleaving *telRL* by staggered cuts, the resulting self-complementary single-stranded DNA overhangs fold back and are re-joined by the protelomerase (9). Besides *tel*, all telomere phages possess the gene *repA*, encoding a multifunctional replication protein. *repA* of N15 and PY54 was shown to harbor the prophage replication origin and to function as a circular

minimal replicon (35, 42). Compatibility studies demonstrated that the N15 and  $\Phi$ KO2 plasmids belong to the same incompatibility group, whereas the PY54 plasmid is able to coexist with these two prophages in doubly lysogenic *E. coli* and *Y. enterocolitica* hosts (19).

There are some reports on the presence of *tel* and *repA* in prophages (VP882, VHML, and Vp58.5) of marine *Vibrio* strains (28, 41). *V. parahaemolyticus* phage VP882 is a close relative of the *Halomonas* phage  $\Phi$ HAP-1 (26). VHML was isolated from a toxin-producing *Vibrio harveyi* strain, pathogenic for some crustaceans and fish (30). Similarly to  $\Phi$ HAP-1 and VP882, VHML has a myovirus-like morphology. The phage contains genes for products similar to Tel and RepA, suggesting that its prophage is a linear plasmid with terminal hairpins. However, it was surmised that VHML integrates into the *Vibrio* chromosome (28, 29). Phage VP58.5 was isolated from a *V. parahaemolyticus* strain belonging to the serovar O3:K6 pandemic clonal complex (41). During the last several years, this clone has been associated with many seafood-borne diarrhea outbreaks in Southeast Asia and South America, particularly Chile (5, 12, 13, 15). Up to 33% of the Chilean isolates harbored a 42-kb plasmid which was shown to be the prophage of a myovirus inducible by mitomycin C. VP58.5 is the prototype of these phages.

In this work we demonstrate that VP58.5 is closely related to the *V. harveyi* phage VHML but that its prophage is a linear plasmid with covalently closed ends. The Vp58.5 prophage belongs to a new incompatibility group of telomere phages.

\* Corresponding author. Mailing address: Bundesinstitut für Risikobewertung, Diagnostik und Genetik, Erregercharakterisierung, Diederdsdorfer Weg 1, D-12277 Berlin, Germany. Phone: 49-30-8412-2019. Fax: 49-30-8412-2000. E-mail: stefan.hertwig@bfr.bund.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jvi.asm.org/>.

‡ These two authors equally contributed to this work.

§ Published ahead of print on 8 July 2009.

### MATERIALS AND METHODS

Bacteriophages, bacterial strains, media, and growth conditions. Phages and strains utilized in this study are listed in Table S1 in the supplemental material.

The *E. coli* strain Genehogs (Invitrogen) was employed for standard cloning procedures. *E. coli* and *V. parahaemolyticus* strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) broth (38) at 37°C under shaking conditions (200 to 225 rpm). For the cultivation of *V. parahaemolyticus*, LB broth was supplemented with sodium chloride to a final concentration of 3% (wt/vol) (41). Solid media contained 1.8% (wt/vol) agar. When required, kanamycin and ampicillin were used as supplements at 100 µg ml<sup>-1</sup> and chloramphenicol and tetracycline were used at 12.5 µg ml<sup>-1</sup>.

**Isolation and purification of VP58.5 phages.** Phages were recovered by mitomycin C (Sigma-Aldrich) induction of *V. parahaemolyticus* strain PMCS8.5. At an adsorption ( $A_{600}$ ) of 0.4, mitomycin C (30 ng ml<sup>-1</sup>) was added and shaking was continued for 4 h (41). Bacterium-free phage lysates were obtained by centrifugation at 12,000 × g for 30 min and filtration of the supernatant through 0.45-µm- and 0.2-µm-pore-size sterile filters (Schleicher und Schüll). Between the filtration steps, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg ml<sup>-1</sup> DNase I, and RNase A (Roche) were applied to the lysate, which was incubated at 37°C for 2 h. Phage particles were concentrated by ultracentrifugation at 230,000 × g for 2 h. Phage pellets were suspended in SM buffer and purified through discontinuous cesium chloride (CsCl) gradients (1.3 to 1.7 g ml<sup>-1</sup>), as described by Sambrook and Russell (38).

**Transmission electron microscopy.** Phage particles were adsorbed onto carbon-coated grids for 5 min and negatively stained with 1% (wt/vol) uranyl acetate (pH 4.5) for 1 min according to the method of Steven et al (39). Micrographs were taken with a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Japan) at 80 kV.

**Extraction and characterization of phage VP58.5 DNA.** Phage DNA was extracted from VP58.5 virus particles by proteinase K-sodium dodecyl sulfate (SDS) treatment followed by phenol-chloroform extraction, as described by Sambrook and Russell (38). To determine the presence of cohesive ends, phage DNA was digested with Van911 (Fermentas). Restriction patterns of unheated and heated phage DNAs were compared. Additionally, phage DNA treated with T4 ligase was analyzed by the same procedure. Protruding nucleotides in the phage DNA were determined by runoff sequencing using the primers *cos-F* (5'-CAGTAAAGTCCCAATCGCTC) and *cos-R* (5'-GTCCATTCGTCAGTT AGTTTC).

**VP58.5 genome sequencing.** Based on the previous determination of partial DNA sequences of phage VP58.5, approximately 100 oligonucleotide primers deduced from the annotated sequence of VHML were employed for genome sequencing (28, 41). One hundred to two hundred nanograms of DNA from CsCl-purified phages was used as template. Gaps between contigs were closed by primer walking. The direct sequencing strategy was also performed for the determination of the cohesive ends. Similarly, the circularly permuted prophage DNA was partially sequenced with the same set of oligonucleotide primers.

**Sequence analysis of the VP58.5 genome.** Sequence analyses and alignments were carried out using the MacVector 8.0 software of the Oxford Molecular Group (Campbell, CA). Putative open reading frames (ORFs) were defined using the algorithms of the software packages MacVector, Accelrys Gene v2.5 (Accelrys Inc.), and ORF Finder (NCBI). BLAST searches were performed at the NCBI homepage (GenBank database) using BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) for calculating similarity and identity values (1).

**Construction of linear and circular miniplasmid derivatives of VP58.5.** To generate the linear miniplasmid pJH1210 (12.4 kb), phage DNA was digested with the restriction endonuclease BglII (Fermentas). After the ends of the restriction fragments were filled in with T4 polymerase, the fragments were ligated to the tetracycline resistance gene of transposon Tn5 that had been amplified by PCR using the vector pBR329 as template (7). The recombinant DNA preparation was introduced into the *E. coli* strain Genehogs. Similarly the circular miniplasmid pJH1201 (6.1 kb) was isolated by digestion of phage VP58.5 DNA with EcoRV (New England Biolabs). The composition of the miniplasmids pJH1201 and pJH1210 was verified by restriction analysis and DNA sequencing.

**Compatibility studies.** Compatibility of the telomere phages was studied with circular miniplasmid derivatives of the prophages retaining replicative competence (see Table S1 in the supplemental material). The Vp58.5 miniplasmid pJH1201 (Tc<sup>r</sup>) was introduced into *E. coli* C-1a and *Y. enterocolitica* 83/88/2. Thereafter, transformants were lysogenized with the N15 mutant C02 (Cm<sup>r</sup>) and PY54 mutant A (Km<sup>r</sup>), respectively (19). Selection of lysogens containing the respective prophage and the miniplasmid pJH1201 was achieved by plating infected bacteria on agar containing tetracycline and kanamycin (pJH1201 and PY54-A) or tetracycline and chloramphenicol (pJH1201 and N15-C02). The presence of the linear prophages and the Vp58.5 miniplasmid in the lysogens was examined by restriction analysis. Similarly, the compatibility of PY54, N15, and ΦKO2 miniplasmids with phage VP58.5 was studied in *V. parahaemolyticus*. For the introduction of the miniplasmids pSH120 (PY54, Km<sup>r</sup>), pJH320 (N15, Cm<sup>r</sup>), and pJH520 (ΦKO2, Tc<sup>r</sup>) into the *V. parahaemolyticus* strain PMCS8.5, the transformation protocol of Hamashima et al. was used (18).

**SDS-PAGE and protein analysis by mass spectrometry.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed according to the method of Laemmli (22). Structural proteins of VP58.5 were separated at 20 mA on a one-dimensional 15% (wt/vol) SDS gel at 15°C. After staining by Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad), protein bands were excised from the gel, washed twice with 50% (vol/vol) acetonitrile in 5 mM ammonium bicarbonate for 1 h, digested with porcine trypsin (Merck), and purified as described previously (21). For the analysis of the proteins, high-pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used, and automated tandem mass spectrometry fragmentation was performed during the high-pressure liquid chromatography run. To determine peptide sequences, tandem mass spectrometry spectra were obtained using a QStar XL hybrid mass spectrometer (Applied Biosystems) with a nanoelectrospray source. The obtained data were submitted to the Mascot web server database (<http://www.matrixscience.com>) (34).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The sequence of phage VP58.5 has been deposited in the GenBank database under accession number FN297812. The GenBank accession numbers of the phage genomes used in this study are as follows: VHML, NC\_004456; VP882, NC\_009016; ΦHAP-1, EU399241; N15, NC\_001901; ΦKO2, NC\_005857; and PY54, NC\_005069 (6, 21, 23, 26, 28, 36).

## RESULTS

**VP58.5 is a close relative of phage VHML.** In a previous study, small DNA fragments of myophage VP58.5 (Fig. 1A) obtained by random molecular cloning and PCR were shown to be highly homologous to sequences of phage VHML (41). Based on this finding, we determined the whole VP58.5 genomic sequence (42,612 nucleotides, 50.9% G+C content) by a direct approach using phage DNA as template and primers deduced from the VHML sequence (see Materials and Methods). Except for an approximately 3-kb-long stretch (positions 22200 to 25200) on the VP58.5 genome that exhibits significant homology to the *V. parahaemolyticus* phage VP882, the remaining VP58.5 DNA is very similar to that of VHML (Fig. 2). On average, the VP58.5 and VHML DNAs are 92% identical. Out of 58 gene products that have been predicted for VP58.5, 44 products revealed values of identity to VHML proteins of more than 91%. In addition, nine other VP58.5 products are similar to VHML proteins, with identity values between 38% and 86%. Like VHML, the capsid proteins and tail proteins of VP58.5 exhibit some relatedness to proteins of lambda-like phages and P2-like phages, respectively. Other nonstructural VP58.5 products (e.g., protelomerase, RepA, and prophage repressor) are similar to telomere phage proteins. Hence, both VHML and VP58.5 are chimeric phages belonging to several phage clusters according to the classification by Lima-Mendez et al (24). Nonetheless, the VP58.5 and VHML genomes differ with respect to their gene order. While the VHML genome has been reported to start with the protelomerase gene which is located close to the center of the VP58.5 genome, the first two ORFs of VP58.5 probably code for the subunits of the terminase (Fig. 2A). The overall genome organization of VP58.5 is strongly reminiscent of those of telomere phages. The genome can be divided into two arms separated by a long (88-bp) palindromic sequence comparable to the telomere resolution sites (*telRL*) of N15, PY54, and ΦKO2. Similar to these phages and also to ΦHAP-1 and VP882, the left arm of the VP58.5 genome mainly consists of genes for structural proteins and phage assembly. The VP58.5 virion protein profile is composed of at least 12 proteins (Fig. 1B). Each of the protein bands was excised from the gel and analyzed by peptide mass fingerprinting. Six of the proteins could be allocated to VP58.5 gene products predicted by in silico analysis (Fig. 1B).

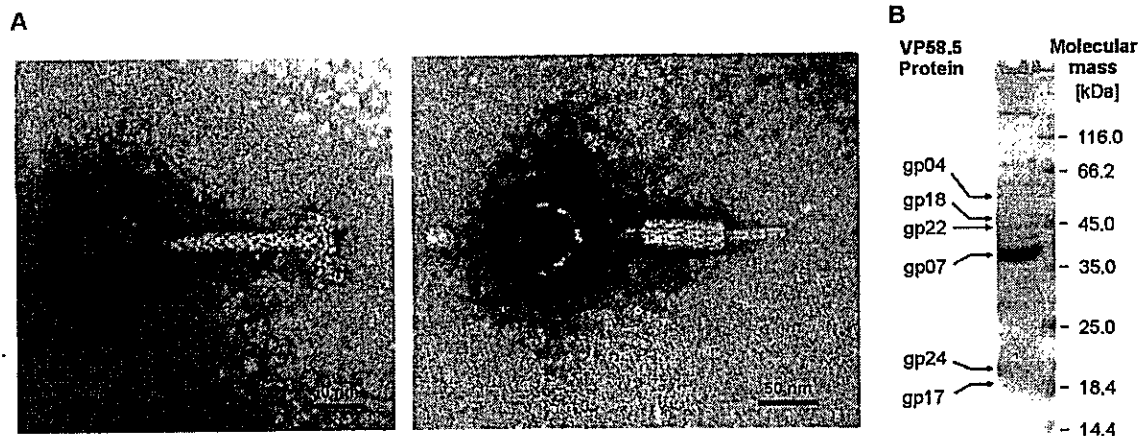


FIG. 1. Morphology and protein composition of phage VP58.5. (A) Transmission electron micrographs of VP58.5 particles. Phages were isolated from *V. parahaemolyticus* pandemic strain PMC58.5 (serovar O3:K6) by induction with mitomycin C. (B) Mass spectrometric analysis of VP58.5 structural proteins. CsCl-purified phages were analyzed by peptide mass fingerprinting. Proteins were separated by SDS-PAGE and assigned to VP58.5 gene products predicted by *in silico* analysis.

We identified the products of ORF 4 (putative portal protein); ORFs 7, 17, and 18 (functions unknown); ORF 22 (putative tail tube protein); and ORF 24 (putative tail protein).

Similarly to  $\Phi$ HAP-1 and VP882, the VP58.5 genome contains a single ORF (ORF 38) at the right end of the left arm whose product (PatA) might be part of a partitioning system. In N15, PY54, and  $\Phi$ KO2, partitioning systems are composed of two proteins (ParA and ParB) encoded by an operon, plus centromere-like sites (*parC*) to which the partitioning proteins bind.

Telomere phages possess a palindromic *telRL* site situated between the two arms of the genome, contiguous to the partitioning genes on the left and to the protelomerase gene on the right. The telomere resolution site is the target for the protelomerase, which generates the hairpin ends of the prophage by processing *telRL*. On the VP58.5 genome, the perfect 88-bp palindrome is located 106 bp upstream of the putative *tel* gene (ORF 40, Fig. 2). Moreover, similarly to *telRL* of phage PY54, the VP58.5 palindrome is flanked by additional inverted repeats (Fig. 3A). Both the palindromes and the predicted *tel* gene products of VP58.5 and VHML are highly homologous (Fig. 3B; see also Fig. S1 in the supplemental material). The protelomerases of the two phages contain identical clusters (motifs A to C) and a pentad ("RKHRH") which are found in several protelomerases and integrases as well (11, 16). In addition, a tyrosine residue ("Y") pivotal for the enzyme's catalytic activity is present at the same position (9). Comparison of the palindromes disclosed that the central 24 bp of the VP58.5 *telRL* site are missing in the otherwise nearly identical VHML sequence (Fig. 3B).

The upstream region of *tel* contains some ORFs whose proposed functions and order are typical for telomere phages. A large ORF (ORF 42) is located to the right of the predicted protelomerase gene, in an orientation opposite that of *tel*. Its possible product has 96% identity to the putative replication protein RepA of VHML and also some similarity to RepA of telomere phages. Moreover, some motifs conserved in bacterial helicases and primases have also been detected in the VP58.5 and VHML replication proteins (data not shown) (17). Next to *repA*, there are two ORFs (ORFs 43 and 44) on the

VP58.5 genome that apparently belong to an immunity region. While the product of ORF 43 is similar to the putative prophage repressors of VHML and VP882, ORF 44 might encode the Cro repressor, 100% identical to the corresponding VHML protein. We additionally searched for possible operator sites which are most often situated between the repressor genes. However, within the 21-bp intergenic region we could not detect any operator-like sequence, while a number of possible promoters have been identified there (data not shown).

Among the remaining ORFs in the right arm of the VP58.5 genome, there are only a few candidates for which a functional assignment could be made. However, many gene products in VP58.5 are probably analogous to proteins in the closely related phage VHML (28). The search for possible  $\rho$ -independent transcription terminators on the VP58.5 genome revealed a number of inverted repeats located immediately downstream from stop codons (Fig. 2A). Most of the repeats have the potential (confidence value = 100%) to form a G+C-rich stem with a loop in the mRNA (10), followed by a run of several thymidine bases, and have also been identified in VHML (see Table S3 in the supplemental material). Hence, it is likely that the two phages possess similar sets of transcripts.

Phage VP58.5 genomic DNA has 5'-protruding ends. Cleavage of the VP58.5 genome by the restriction endonuclease *Van91I* revealed two DNA fragments (4.8 kb and 3.2 kb) which appeared as weak bands on an agarose gel (Fig. 4A, lane 1). After heating of the digested phage DNA at 60°C for 5 min and immediate chilling on ice, the two particular restriction fragments had the same intensities as those of other *Van91I* fragments, suggesting that they contain cohesive ends (Fig. 4A, lane 2). This was confirmed by treatment of the DNA with T4 ligase prior to digestion. A new restriction fragment of 8 kb appeared, while the two smaller fragments were not detectable, even after heating (Fig. 4A, lanes 4 and 5). To define *cos* on the phage DNA, we sequenced the ends of the genome using primers (*cos-F* and *cos-R*) deduced from adjacent regions. Alignment of the sequences revealed an overlap of 11

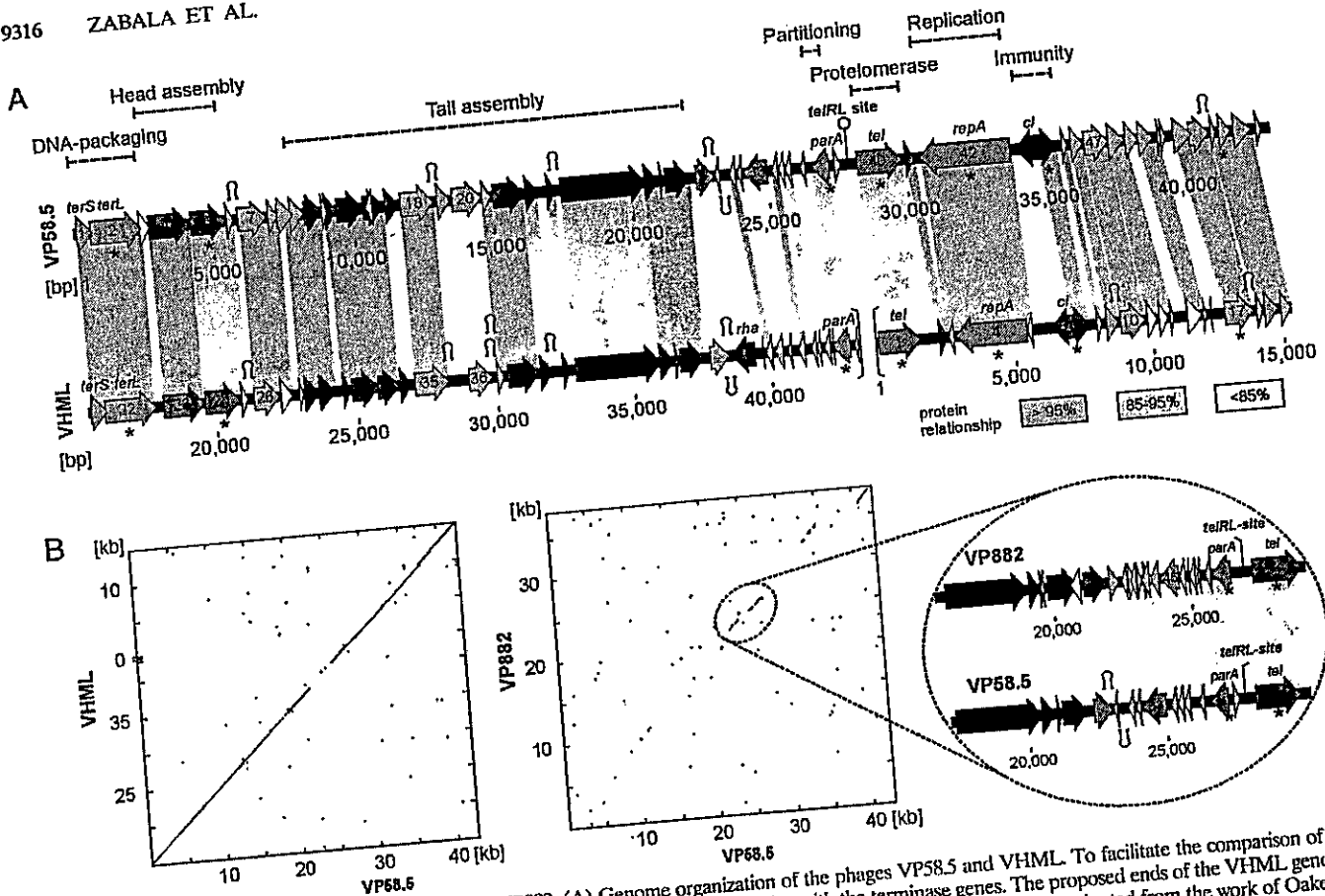


FIG. 2. Relationship of VP58.5 to VHML and VP882. (A) Genome organization of the phages VP58.5 and VHML. To facilitate the comparison of the phage genomes, the VHML DNA is depicted in the same gene order as VP58.5, starting with the terminase genes. The proposed ends of the VHML genome are indicated by brackets. Numbering of VHML ORFs and that of the nucleotide positions on the VHML genome were adopted from the work of Oakey et al (28). The colors indicate predicted functions of gene products as follows: green, DNA packaging; violet, head assembly; blue, tail assembly; brown, plasmid stability/partitioning; mauve, telomere resolution; orange, replication; red, repressor; pink, product with other function; gray, putative protein; white, unknown. Related genes of the phages are connected by colored shading. Selected ORFs are denoted by asterisks. Genes whose products show similarities to N15-like phages (N15, PY54, and  $\Phi$ KO2) are marked by asterisks (see Table S2 in the supplemental material). The positions of putative Rho-independent transcription terminators are indicated by the character  $\Omega$  (see Table S3 in the supplemental material) (4). (B) Dot plot matrices of bacteriophage VP58.5 with the *Vibrio* phages VHML and VP882. The axes of abscissas and ordinates show the coordinates of the respective phage genomes. Nucleotide alignments were performed with MacVector (version 8.0; Oxford Molecular Group). On the right, the DNA region similar in VP58.5 and VP882 is shown in detail.

nucleotides, which means that the phage genome possesses 11 nucleotides protruding at the 5' ends.  
 The Vp58.5 prophage is a linear plasmid with covalently closed ends. It has been reported that the Vp58.5 prophage

exists as an extrachromosomal DNA which can be recovered by alkaline extraction of cells (41). The plasmid showed restriction patterns similar to those of the phage genome, indicating that both molecules are circularly permuted. In this study, we

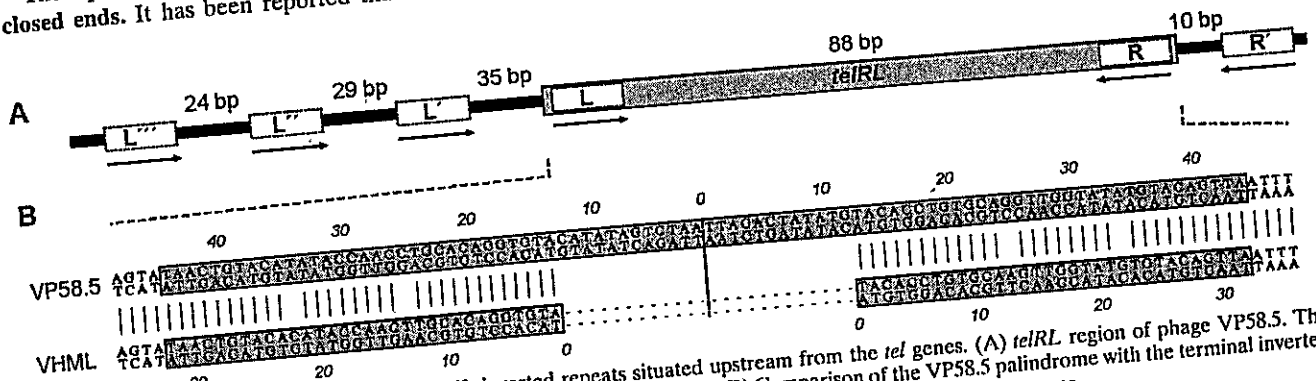


FIG. 3. Alignment of the VP58.5 and VHML inverted repeats situated upstream from the *tel* genes. (A) *telRL* region of phage VP58.5. The 88-bp palindromic (*telRL*) is flanked by additional inverted repeats (L and R). (B) Comparison of the VP58.5 palindromic with the terminal inverted repeat of the VHML genome (28). The central 24 bp of the VP58.5 *telRL* site are missing in the VHML sequence.



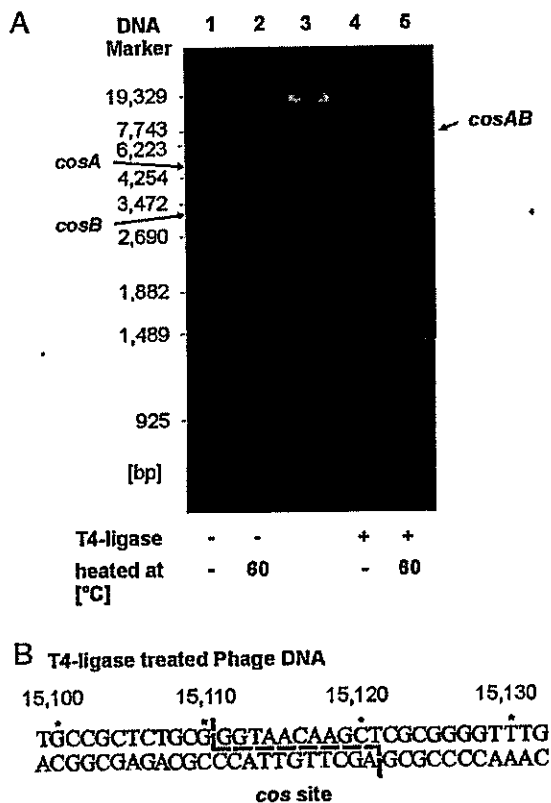


FIG. 4. Analysis of the VP58.5 *cos* region. (A) Van9II restriction patterns of VP58.5 phage DNA. Lane 1, restriction pattern of untreated phage DNA; lane 2, same DNA as in lane 1 but heated for 5 min at 60°C before being loaded onto the gel; lane 3, DNA size marker ( $\lambda$  DNA Eco130I); lanes 4 and 5, unheated and heated phage DNA, respectively, that had been treated with T4 ligase before digestion. (B) Sequence of the *cos* region after treatment of the phage DNA with T4 ligase. The overhanging nucleotides determined in untreated phage DNA are marked.

investigated the circular permutation of the VP58.5 phage genome and plasmid as well as the structure of the plasmid ends in more detail. Figure 5A shows the Van9II restriction patterns of VP58.5 phage and plasmid DNA. As described above, the phage DNA displayed two weak *cos* fragments (*cosA* and *cosB*) lacking in the plasmid. On the other hand, two restriction fragments (*telL*, 2.8 kb, and *telR*, 2.7 kb) were present in the prophage but missing in the phage DNA. Instead, a 5.5-kb restriction fragment (*telRL*) was visible in the digest of the phage genome. Based on the different restriction patterns and on the complete sequence of the VP58.5 genome, physical maps of the linear phage DNA and prophage have been devised (data not shown). The molecules are 35% circularly permuted.

To elucidate whether the Vp58.5 prophage contains terminal hairpins, restriction analyses under native and denaturing conditions have been performed (14, 25). For this study, the restriction endonuclease BglII was used because this enzyme cleaves the linear plasmid into only four fragments. Figure 5B shows that the two terminal BglII fragments (9.1 kb and 2.0 kb) exhibited twice the length on an alkaline agarose gel while the remaining restriction fragments showed the same length as

that under nondenaturing conditions. The same result was obtained with prophage DNA that had been treated with proteinase K prior to analysis. From these experiments, it can be inferred that the ends of the plasmid prophage are not bound to protein but contain an additional covalent linkage that must be part of a hairpin-like structure.

VP58.5 belongs to a new incompatibility group of telomere phages. To learn more about the replicative functions of VP58.5 genes, we designed linear and circular miniplasmid derivatives of the prophage retaining replicative competence. Plasmid pJH1210 is composed of the 11.1-kb BglII phage DNA fragment (nucleotide positions 25511 to 36631) and *tet*. It contains 11 VP58.5 ORFs, including *paraA*, *tel*, *repA*, and the putative repressor genes *cI* and *cro*. Restriction of the plasmid by BglII resulted in three fragments, namely, *tel* and the two terminal 9.1-kb and 2.0-kb fragments of the prophage which harbor the telomeres (data not shown). Hence, pJH1210 possesses all genetic elements essential for linear plasmid replication.

The circular miniplasmid pJH1201 comprises the 4.8-kb EcoRV fragment of the prophage (nucleotide positions 30285 to 35109) with the genes *repA* and *cI* plus a number of ORFs of unknown function lying in between these genes (see Table S2 in the supplemental material). Transformation experiments revealed that the plasmid is able to replicate in *V. parahaemolyticus* and also in *E. coli* and *Y. enterocolitica*. To study the compatibility between pJH1201 and other telomere phage replicons, *E. coli* and *Yersinia* transformants harboring pJH1201 were lysogenized with the phage mutants N15-C02 (Cm<sup>r</sup>) and PY54-A (Km<sup>r</sup>), respectively, described in a previous study (19). Doubly resistant lysogens which appeared on selective agar were analyzed with respect to their plasmid content. All of them contained plasmid pJH1201 and the respective prophage. We also investigated the compatibility of PY54, N15, and  $\Phi$ KO2 miniplasmids with phage VP58.5 in *V. parahaemolyticus*. This was accomplished by introduction of the miniplasmids pSH120 (PY54, Km<sup>r</sup>), pJH320 (N15, Cm<sup>r</sup>), and pJH520 ( $\Phi$ KO2, Tc<sup>r</sup>) into the lysogenic *V. parahaemolyticus* strain PMC58.5. Similarly to the situation in *E. coli* and *Yersinia*, the VP58.5 prophage coexisted with the other plasmids in *Vibrio*. Therefore, VP58.5 belongs to a new incompatibility group of telomere phages.

## DISCUSSION

*V. parahaemolyticus* O3:K6 pandemic strains isolated in Chile frequently possess a 42-kb plasmid which was shown to be the prophage of a myovirus (41). The determination of the complete DNA sequence of the prototype phage VP58.5 revealed very strong similarity to phage VHML. Besides *V. harveyi* strains, VHML has been reported to lyse the strains *Vibrio alginolyticus* ACMM102 and *Vibrio cholerae* ATCC 14035, but there are no published data on the infectiousness for *V. parahaemolyticus* (33). On the other hand, we could not find a *V. harveyi* strain susceptible to VP58.5. The question arises why VP58.5 and VHML infect a different spectrum of bacteria. The close relationship suggests that the phages have a common ancestor. They share similar morphologies, and most of their gene products are 92 to 100% identical. However, the predicted tail fiber proteins of VP58.5 and VHML are only 77%

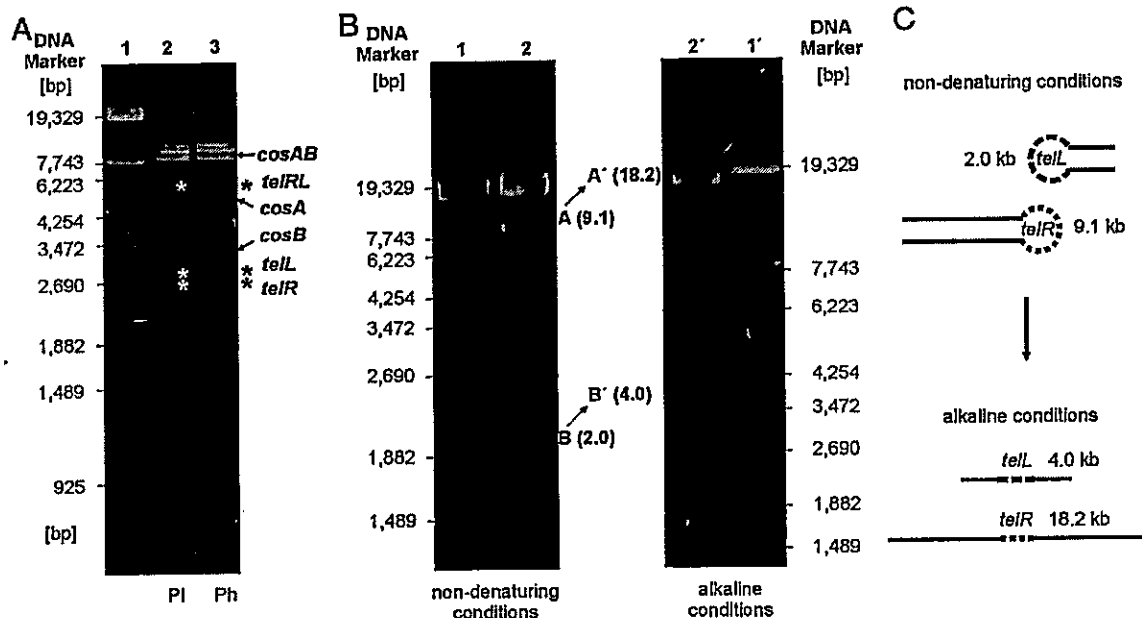


FIG. 5. Determination of the covalently closed ends of the Vp58.5 plasmid. (A) Comparison of Van911 restriction patterns of the Vp58.5 plasmid (PI) and phage DNA (Ph). Lane 1, DNA size marker ( $\lambda$  Eco130I); lane 2, Van911-digested plasmid; lane 3, Van911-digested phage DNA. Asterisks indicate the terminal restriction fragments of the plasmid and the corresponding fragment of the phage DNA. *cos* fragments of the phage DNA are also marked. (B) BglII-digested prophage DNA was separated on 0.8% agarose gels under non-denaturing (left panel) and alkaline (right panel) conditions. Restriction fragments containing the left and right telomeres of the prophage plasmid exhibited twice the length under denaturing conditions. (C) Schematic presentation of the structure of the terminal prophage fragments under native and alkaline conditions.

identical and might therefore account for the divergent host range of the phages by binding to different receptors on the cell surface. Adjacent to the tail assembly module, the VP58.5 genome contains some genes (ORFs 30, 31, 32, and 35, Fig. 2B) whose products are similar to proteins of the *V. parahaemolyticus* phage VP882 isolated from an O3:K6 strain in Taiwan. The function of these genes is unknown, and it cannot be excluded that they play a role in host specificity. Yet, VP882 has a broader host range than does VP58.5 and infects a high proportion of *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *V. cholerae* strains (23).

On the basis of the strong sequence similarity between VP58.5 and VHML, it is tempting to speculate that the two phages have the same lifestyle. Thus, it is notable that the Vp58.5 prophage is a linear plasmid with covalently closed ends whereas VHML was suggested to integrate into the host cell's chromosome (28, 29). Linear plasmid replication of telomere phages requires four components: (i) a multifunctional replication protein (RepA), (ii) an origin of replication (*ori*) located within *repA*, (iii) a protelomerase (Tel), and (iv) a telomere resolution site (*telRL*), which is the target of Tel (37). All of these elements exist in VP58.5 and VHML. The predicted RepA proteins of the phages are 96% identical. The construction of the replicative circular miniplasmid pJH1201 comprising a 4.8-kb restriction fragment of the Vp58.5 prophage indicated that the origin of this phage is located close to or even within *repA*, similarly to the replication genes of N15, PY54, and  $\Phi$ KO2 (35, 42). Plasmid pJH1201 coexists with the aforementioned prophages in the same cell. Thus, there are currently three incompatibility groups of telomere phages: (i) N15/ $\Phi$ KO2, (ii) PY54, and (iii) VP58.5. Due to the close re-

lationship of VHML and VP58.5, it is likely that VHML and VP58.5 belong to the same group, while the more distantly related phages  $\Phi$ HAP-1 and VP882 may constitute a fourth incompatibility group.

For the conversion of the linear phage genome into the linear plasmid and for linear plasmid replication, a protelomerase, which processes the telomere resolution site *telRL*, is essential (8). Both elements can be identified in VP58.5 and VHML. The putative protelomerases are 92% identical and contain all motifs conserved in other protelomerases and integrases (see Fig. S1 in the supplemental material) (11). Upstream of the respective *tel* gene, both phages harbor a large inverted repeat of 88 bp (VP58.5) or 66 bp (VHML) (28). The VP58.5 repeat is a perfect palindrome and apparently the target for the protelomerase of this phage (Fig. 3). Although its overall similarity to *telRL* sites of other telomere phages is low, an alternating 11-bp Pur/Py sequence is located close to the palindrome center that is likely to form a region of Z-DNA structure (37). The VHML repeat is very similar to the VP58.5 sequence. However, 24 nucleotides in the center of the VP58.5 palindrome are absent in VHML. The core region of the telomere resolution site is crucial for processing (9). Therefore, it is conceivable that the VHML inverted repeat may not function as a substrate for the VHML protelomerase to generate a linear plasmid. Interestingly, the two arms of the inverted repeat were reported to be the termini of the VHML phage genome (28). In contrast, VP58.5 phage DNA contains cohesive ends. The *cos* site of VP58.5 also exists in VHML, and its flanking DNA sequences, which harbor some repeats, are almost identically present in the *V. harveyi* phage. Only 4 out of 500 nucleotides are divergent within this DNA region. In view

of the fact that the predicted terminase subunits of the phages are 98% and 99% identical, it is puzzling why the VHML phage DNA does not possess cohesive ends but a terminal inverted repeat which corresponds to the ends of the VP58.5 plasmid prophage. Oakey et al. speculated that, upon infection of a susceptible host, the phage VHML genome becomes integrated into the bacterial chromosome by a transposition mechanism, similar to that of phage Mu (28). In this model, the terminal inverted repeat of the phage DNA was suggested to function as the core sequence recognized by a recombinase, the possible VHML ORF 10 product. A transposase and the protelomerase of VHML were also reported to be implicated in the integration of the phage genome (29). It is noteworthy that VP58.5 contains two ORFs (ORF 20 and ORF 47) whose possible products might function as a recombinase and a transposase, 99% and 80% identical to the corresponding VHML proteins, respectively. Nevertheless, our data clearly demonstrate that the VP58.5 prophage is a linear plasmid with terminal hairpins, whereas integration into the *V. parahaemolyticus* chromosome was not observed (data not shown). Therefore, it remains open why the two closely related phages exhibit such different properties. The intriguing question arises whether the central part of the large VP58.5 palindrome which is lacking in the terminal VHML repeat may be responsible for the different lifestyles of the phages. Lima-Mendez et al. supposed that the VHML prophage may be a linear plasmid as well because it encodes a protelomerase and a plasmid-partitioning protein (24). We would have liked to verify this assumption by suitable experiments, but unfortunately VHML was not made available for this study. It has been reported elsewhere that the phage was lost (26). Thus, to elucidate the importance of the central nucleotides of the VP58.5 palindrome for linear plasmid replication, a deletion could be introduced into the *tel* site of this phage by homologous recombination. Alternatively, the VP58.5 protelomerase could be purified and used for in vitro assays with the *tel* sites of VP58.5 and VHML.

Phage VHML has been associated with the virulence of *V. harveyi* strains for some marine animals (2, 27, 30, 31). It has been reported elsewhere that after infection with VHML, the phenotypic profile of the bacteria changed (40). Production of hemolysin was upregulated, and some toxin-related proteins were secreted by the lysogens (27). Oakey et al. speculated that the VHML ORF 17 product, a putative adenine methyltransferase (Dam), might be involved in virulence by acting as a transcriptional regulator. In addition, this protein contains a motif similarly detected in some ADP-ribosylating toxins (28, 29). A Dam methylase was also reported to be associated with the virulence of *V. parahaemolyticus* strains harboring phage VP882 (23). Phage VP58.5 possesses two overlapping ORFs whose possible products are 98% and 100% identical, respectively, to the proposed VHML adenine methyltransferase. However, a possible relation of VP58.5 or its methyltransferases with the virulence of the pandemic *V. parahaemolyticus* strain has not been studied yet. Nonetheless, oceanic phages are generally critical components of the global ecosystem, where they play a major role in bacterial mortality, gene expression, and evolution (32). Temperate phages can increase the host's sensitivity to environmental factors, as demonstrated for the enhancement of UV light sensitivity mediated by VP58.5

(41). In addition, phages participate in the evolution of marine bacteria as an efficient horizontal gene transfer factor (3).

In conclusion there are seven temperate phages known to possess a protelomerase gene. According to their morphology, these phages can be divided into two subgroups, the siphoviruses N15, PY54, and  $\Phi$ KO2 isolated from the *Enterobacteriaceae* and the marine myoviruses  $\Phi$ HAP-1, VP882, VP58.5, and VHML (23, 26, 29, 41). In spite of the fact that siphoviruses and myoviruses belong to different phage families, telomere phages described so far are very similar in terms of their gene content and genome organization (24). Additional sequence data on new telomere phages will make it easier to answer the question of whether all members of this group share a common ancestor.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jochen Reetz and Maria Vargas from the Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) for electron microscopy of phage VP58.5 and Erich Lanka for critical reading of the manuscript. We are also indebted to Sebastian Beck from the Humboldt-Universität Berlin for his support in mass spectrometry.

Beatriz Zabala acknowledges a scholarship from Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD). Her work was supported in part by a grant from FONDECYT, 1070658. The work of J. A. Hammerl was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

#### REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Austin, B., A. C. Pride, and G. A. Rhodle. 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *J. Fish Dis.* 26:55-58.
- Breibart, M., and F. Rohwer. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* 13:278-284.
- Brown, C. M., M. E. Dalphin, P. A. Stockwell, and W. P. Tate. 1993. The translational termination signal database. *Nucleic Acids Res.* 21:3119-3123.
- Cabello, F. C., R. T. Espejo, M. C. Hernandez, M. L. Riosco, J. Ulloa, and J. A. Vergara. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* 13:655-656.
- Casjens, S. R., E. B. Gilcrease, W. M. Huang, K. L. Bunney, M. L. Pedulla, M. E. Ford, J. M. Houtz, G. F. Hattall, and R. W. Hendrix. 2004. The  $\Phi$ KO2 linear plasmid prophage of *Klebsiella oxytoca*. *J. Bacteriol.* 186:1818-1832.
- Covarrubias, L., and F. Bolivar. 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* 17:79-89.
- Deneke, J., G. Ziegelin, R. Lurz, and E. Lanka. 2000. The protelomerase of temperate *Escherichia coli* phage N15 has cleaving-joining activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7721-7726.
- Deneke, J., G. Ziegelin, R. Lurz, and E. Lanka. 2002. Phage N15 telomere resolution. Target requirements for recognition and processing by the protelomerase. *J. Biol. Chem.* 277:10410-10419.
- Ermolaeva, M. D., H. G. Khalak, O. White, H. O. Smith, and S. L. Salzberg. 2000. Prediction of transcription terminators in bacterial genomes. *J. Mol. Biol.* 301:27-33.
- Esposito, D., and J. J. Scoeca. 1997. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* 25:3605-3614.
- Fuenzalida, L., L. Armijo, B. Zabala, C. Hernandez, M. L. Riosco, C. Riquelme, and R. T. Espejo. 2007. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 117:270-275.
- Fuenzalida, L., C. Hernandez, J. Toro, M. L. Riosco, J. Romero, and R. T. Espejo. 2006. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ. Microbiol.* 8:675-683.
- Fuerste, J. P., W. Pansegrau, G. Ziegelin, M. Kroeger, and E. Lanka. 1989. Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1771-1775.
- Gonzalez-Escalona, N., V. Cachicón, C. Acevedo, M. L. Riosco, J. A. Vergara, F. Cabello, J. Romero, and R. T. Espejo. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11:129-131.
- Groth, A. C., and M. P. Calos. 2004. Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol.* 335:667-678.

17. Hall, M. C., and S. W. Matson. 1999. Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* 34:867-877.
18. Hamashima, H., M. Iwasaki, and T. Arai. 1995. A simple and rapid method for transformation of *Vibrio* species by electroporation. *Methods Mol. Biol.* 47:155-160.
19. Hammerl, J. A., I. Klein, B. Appel, and S. Hertwig. 2007. Interplay between the temperate phages PY54 and N15, linear plasmid prophages with covalently closed ends. *J. Bacteriol.* 189:8366-8370.
20. Hertwig, S., I. Klein, R. Lurz, E. Lanka, and B. Appel. 2003. PY54, a linear plasmid prophage of *Yersinia enterocolitica* with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* 48:989-1003.
21. Hertwig, S., I. Klein, V. Schmidt, S. Beck, J. A. Hammerl, and B. Appel. 2003. Sequence analysis of the genome of the temperate *Yersinia enterocolitica* phage PY54. *J. Mol. Biol.* 331:605-622.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
23. Lan, S. F., C. H. Huang, C. H. Chang, W. C. Liao, I. H. Lin, W. N. Jian, Y. G. Wu, S. Y. Chen, and H. C. Wong. 2009. Characterization of a new plasmid-like prophage in a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2659-2667.
24. Lima-Mendez, G., J. van Helden, A. Toussaint, and R. Leplae. 2008. Reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes. *Mol. Biol. Evol.* 25:762-777.
25. McDonnell, M. W., M. N. Simon, and F. W. Studier. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110:119-146.
26. Mobberley, J. M., R. N. Authement, A. M. Segall, and J. H. Paul. 2008. The temperate marine phage  $\Phi$ HAP-1 of *Halomonas aquamarina* possesses a linear plasmid-like prophage genome. *J. Virol.* 82:6618-6630.
27. Munro, J., J. Onkey, E. Bromage, and L. Owens. 2003. Experimental bacteriophage-mediated virulence in strains of *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Organ.* 54:187-194.
28. Onkey, H. J., B. R. Cullen, and L. Owens. 2002. The complete nucleotide sequence of the *Vibrio harveyi* bacteriophage VHML. *J. Appl. Microbiol.* 93:1089-1098.
29. Onkey, H. J., B. R. Cullen, and L. Owens. 2005. A hypothetical model for VHML phage conversion of *Vibrio harveyi*. *Dis. Asian Aquac.* V:457-464.
30. Onkey, H. J., and L. Owens. 2000. A new bacteriophage, VHML, isolated from a toxin-producing strain of *Vibrio harveyi* in tropical Australia. *J. Appl. Microbiol.* 89:702-709.
31. Owens, L., and N. Busico-Salcedo. 2006. *Vibrio harveyi*: pretty problems in paradise, p. 266-280. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings (ed.), *The biology of the vibrios*. ASM Press, Washington, DC.
32. 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.
33. Payne, M., J. Onkey, and L. Owens. 2004. The ability of two different *Vibrio* spp. bacteriophages to infect *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J. Appl. Microbiol.* 97:663-672.
34. Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567.
35. Ravin, N. V., V. V. Kuprianov, E. B. Gilcrease, and S. R. Casjens. 2003. Bidirectional replication from an internal *ori* site of the linear N15 plasmid prophage. *Nucleic Acids Res.* 31:6552-6560.
36. Ravin, V., N. Ravin, S. Casjens, M. E. Ford, G. F. Hatfull, and R. W. Hendrix. 2000. Genomic sequence and analysis of the atypical temperate bacteriophage N15. *J. Mol. Biol.* 299:53-73.
37. Rybchin, V. N., and A. N. Svarchevsky. 1999. The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* 33:895-903.
38. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
39. Steven, A. C., B. L. Trus, J. V. Maizel, M. Unser, D. A. Parry, J. S. Wall, J. F. Hainfeld, and F. W. Studier. 1988. Molecular substructure of a viral receptor-recognition protein. The gp17 tail-fiber of bacteriophage T7. *J. Mol. Biol.* 200:351-365.
40. Vidgen, M., J. Carson, M. Higgins, and L. Owens. 2006. Changes to the phenotypic profile of *Vibrio harveyi* when infected with the *Vibrio harveyi* myovirus-like (VHML) bacteriophage. *J. Appl. Microbiol.* 100:481-487.
41. Zabala, B., K. Garcia, and R. T. Espejo. 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.
42. Ziegelin, G., N. Tegtmeier, R. Lurz, S. Hertwig, J. Hammerl, B. Appel, and E. Lanka. 2005. The *repA* gene of the linear *Yersinia enterocolitica* prophage PY54 functions as a circular minimal replicon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:3445-3454.

Foto del fago VP58.5, en la portada de la revista AEM, marzo de 2009.

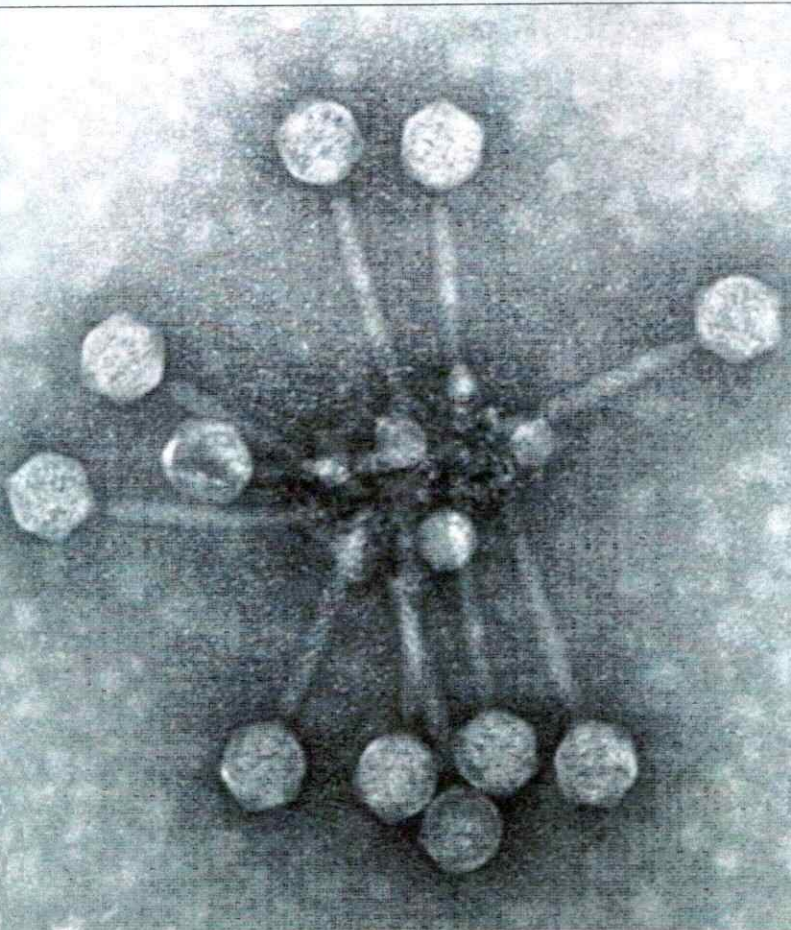
March 2009 • Volume 75 • Number 6

March 2009 • Volume 75 • Number 6

# APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

Pages 1471-1800



published twice monthly by



AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGY