

PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA
DE
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*,
SU EXPRESIÓN EN RESPUESTA A SEÑALES DEL MEDIO
AMBIENTE Y SU PARTICIPACIÓN EN LA VIRULENCIA DE LA
BACTERIA.

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar el grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología
Facultad de Ciencias

por

Inés Calderón Rivera

Marzo, 1999

Director de Tesis: Dr. Guido C. Mora L.

Co-Director de Tesis: Dr. Alejandro Venegas.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE.

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

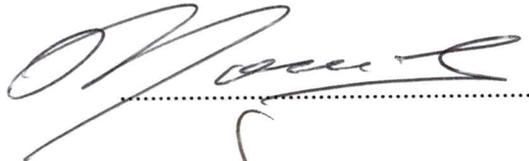
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

INES CALDERÓN RIVERA.

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 5, del mes de Enero, del año 1998 .

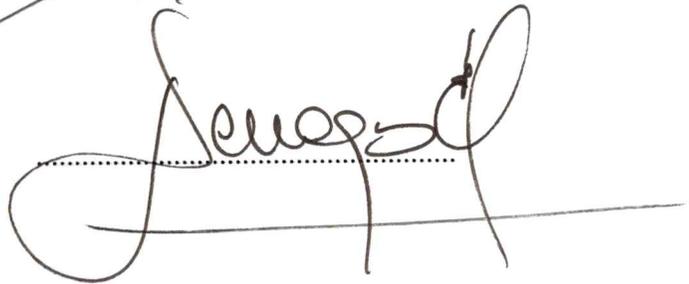
Director de Tesis:

Dr. Guido Mora



Co-Director de Tesis:

Dr. Alejandro Venegas



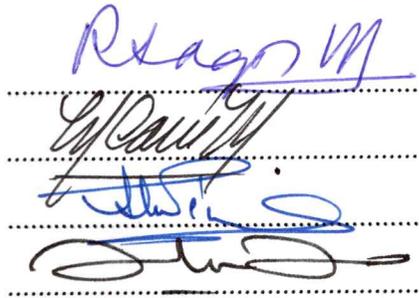
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos

Dra. Margarita Carú

Dra. Luz María Pérez

Dr. Carlos Jeréz



A mis tres amores

Samuel

Carolina y Pamela

sin quienes no habría sido posible cumplir con las metas de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guido Mora por haberme acogido en su grupo de trabajo, guiado en esta tesis y confiado en mí. Por su apoyo incondicional, por su especial humor y amistad.

Al Dr. Alejandro Venegas por su valiosa y permanente ayuda como co-tutor en esta tesis, su incansable aporte de ideas y meticulosa corrección de mis escritos.

A mi hija Carolina, de todo corazón, por haber sido mi compañía durante largas noches en la preparación de este trabajo, de hacerse responsable de la impresión y compaginación de éste, y de la preparación e inserción de todas las figuras.

Al Dr. Manuel Rodríguez por acogerme en su laboratorio, preocuparse constantemente de mi trabajo y por su valiosa ayuda .

A María Isabel Gómez por su inestimable ayuda cada vez que fué necesaria. Por su impecable trabajo y apoyo técnico en el desarrollo de algunos experimentos.

A las Drs. Ana M. Mujica y Gloria Montenegro, a Luis González P. por su colaboración en el trabajo de microscopía óptica y electrónica.

A Víctor Ahumada, por el constante apoyo técnico a mi tesis, su incondicional dedicación al trabajo del laboratorio, y la preocupación por nuestra convivencia.

A Cecilia, Nancy, Carlos , Gonzalo y Víctor por sus comentarios e ideas, consejos, cálculos, préstamos, búsquedas, bromas y todos aquellos aportes intelectuales y espirituales de los cuales gocé mientras estuve en su compañía.

A Augusto Manubens, por todo el tiempo y dedicación con que me ayudó a iniciar la parte experimental de este trabajo .

A Bruno, por su excelente voluntad para ayudarme a solucionar problemas.

A Elsa Bruce por su gran ayuda en el desarrollo de ciertos experimentos .

A María Angélica, José y Orlando por todo el afecto que me han demostrado por tantos años.

En especial a mi familia: por haber estado siempre a mi lado, brindándome su cariño y apoyo, asumiendo tareas que me correspondían, perdonando mis ausencias y alegrándose por cada resultado exitoso; a Samuel por su incesante estímulo a seguir adelante y a Carolina y Pamela por haber iluminado mi vida.

Esta tesis contó con el financiamiento de los proyectos : FONDEF AN-09, FONDECYT 1940713 y 1940655

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1.- Materiales	17
1.1 Cepas, fagos y plásmidos.....	17
1.2 Sueros antiproteínas de membrana externa.....	18
1.3 Tubérculos de papas	18
1.4 Reactivos químicos	19
2.- Métodos.	
2.1 Crecimiento y mantención de las cepas.	20
2.2 Determinación de características bioquímicas y fisiológicas de las cepas ...	21
2.2.1 Fuente de carbono.....	21
2.2.2 Producción de ácidos.....	21
2.2.3 Hidrólisis de gelatina.....	21
2.2.4 Crecimiento en NaCl.....	21
2.2.5 Motilidad.....	21
2.2.6 Degradación de polipectato	22
2.2.7 Producción de acetoina, indol, acidez bajo pH 4,5 , H ₂ S.	22
2.2.8 Disponibilidad de Oxígeno	22
2.2.9 Crecimiento en alta osmolaridad	22

2.3 Tubérculos de papas	24
2.3.1 Crecimiento de bacterias en medio que contiene papas como sustrato	24
2.3.1 Ensayos de virulencia-maceración.....	25
2.4 Microscopía	25
2.4.1 Microscopía óptica	26
2.4.2 Microscopía electrónica de barrido	26
2.5 Proteínas	26
2.5.1 Preparación de membrana externa.....	26
2.5.2 Cuantificación de proteínas	27
2.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	27
2.5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS-urea.....	29
2.5.5 "Immunoblot"	29
2.6 Mutagénesis por recombinación homóloga	30
2.6.1 Producción de lisados	31
2.6.2 Titulación de los lisados	31
2.6.3 Transducción de marcadores genéticos desde <i>S. typhimurium</i> a <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	31
2.7 Transformación	32
2.7.1 Preparación de células competentes por el método de CaCl ₂	32
2.7.2 Transformación de células competentes	32
2.7.3 Preparación de células electrocompetentes	33
2.7.4 Transformación por electroporación	33
2.8 DNA	34
2.8.1 Preparación de DNA genómico bacteriano	34
2.8.2 Obtención de DNA plasmidial	35
2.8.3 Purificación de DNA plasmidial	35
2.8.4 Electroforesis en geles de agarosa	36
2.8.5 Digestión del DNA con enzimas de restricción	36
2.8.6 Identificación de la inserción Tn 10 en el DNA de las mutantes mediante PCR	37
2.8.7 Desestabilización de plásmidos	37
2.8.8 Verificación de la estabilidad de plásmidos en <i>Ecc</i>	38
2.9 Determinación de la producción de exoenzimas por ensayo en placas.....	38
2.9.1 Producción de pectinasas	39
2.9.2 Producción de proteasas	39
2.9.3 Producción de celulasas	39
2.10 Determinación de la sensibilidad a antibióticos(Cálculo del MIC)	40
2.11 Aislamiento de mutantes tet ^s	40

RESULTADOS	41
1. Caracterización de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71	41
1.1 Características metabólicas	41
1.2 Observación microscópica de la invasión de tejidos de tubérculos de papas por <i>Ecc</i> 71	41
1.3 Maceración del tubérculo de papa.	48
1.4 Perfil de proteínas de membrana externa de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71	50
1.5 Identificación de dos proteínas de membrana externa de <i>Ecc</i> 71	53
1.6 Regulación de la expresión de proteínas de membrana externa dependiendo de las condiciones ambientales... ..	56
1.6.1 Efecto de la osmolaridad	56
1.6.2 Efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de ME ..	58
1.6.3 Efecto del medio de cultivo en la expresión de proteínas de ME...	61
1.6.4 Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la expresión de proteínas de la ME.	64
1.7 Determinación de la sensibilidad a antibióticos de <i>Ecc</i> 71	69
1.8 Efecto del gen <i>micF</i> de <i>S. typhi</i> en la expresión de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71	70
2.- Obtención de mutantes de <i>Erwinia carotovora</i> subs. <i>carotovora</i> mediante recombinación homóloga.	76
2.1 Producción de lisados de <i>S. typhimurium</i> mediante el fago P22	77
2.2 Transducción de marcas a <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71	77
2.3 Análisis fenotípico de las mutantes tet ^R de <i>Ecc</i> 71	79
2.3.1 Proteínas de membrana externa.....	80
2.3.2 Características metabólicas de las mutantes <i>Ecc</i> tet ^R	84
2.3.2.1 Auxotrofia.....	84
2.3.2.2 Resistencia a sales biliares	84
2.3.2.3 Velocidad de crecimiento	84
2.3.2.4 Producción de exoenzimas	87
2.3.2.5 Sensibilidad a antibióticos	89
2.3.3 Morfología colonial	90
2.3.4 Motilidad	91

2.4 Detección de la inserción Tn 10 en las mutantes tet ^R de <i>Ecc</i> 71.	91
2.5 Determinación de la virulencia de las mutantes OmpE ⁽⁻⁾	94
3. Intento de recuperación del fenotipo virulento de las mutantes OmpE ⁽⁻⁾ de <i>Ecc</i> 71.	98
3.1 Uso de recombinación homóloga mediante el fago P22.	98
3.2 Complementación del fenotipo OmpE ⁽⁻⁾ de <i>Ecc</i> mediante el plásmido pSTP2B1.	99
3.2.1 Aislamiento e identificación de pSTP2B1 en los clones resis- tes a ampicilina	102
3.2.2 Caracterización de la proteína expresada por el clon 311(5) pSTP2B1.	103
3.2.3 Virulencia del clon transformante 311(5) que contiene el plásmido pSTP2B1	108
3.3 Intercambio de marca genética	111
DISCUSIÓN	112
CONCLUSIONES	136
APÉNDICE	138
BIBLIOGRAFÍA	139

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1.- Cepas bacterianas	17
2.- Fago y plásmidos	18
3.- Características bioquímicas, fisiológicas y de cultivo de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71, <i>E. coli</i> K12 y de <i>S. typhimurium</i>	42
4.- Valores de la razón OmpE/OmpA de la ME de <i>Ecc</i> 71 crecida bajo diferentes condiciones de temperatura y medios de cultivo	60
5.- Valores de la razón OmpE/OmpA de la ME de <i>Ecc</i> 71 crecida bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno y temperatura	64
6.- Expresión de las proteínas de ME OmpE/OmpA de <i>Ecc</i> 71 dependiendo de la osmolaridad, temperatura, medio de cultivo y disponibilidad de oxígeno del medio	68
7.- MICs para la cepa <i>Ecc</i> 71 mediante el procedimiento de dilución en caldo..	69
8.- Valores de la razón OmpE/OmpA de la ME de <i>Ecc</i> 71 parental y del clon <i>Ecc</i> 71 (pSTP2Kmic), y de OmpF/OmpC de ME de <i>E. coli</i> K12 parental y del clon <i>E. coli</i> (pSTP2Kmic) obtenidos de las densitometrías del PAGE-SDS-urea de la figura 19B.	75
9.- Mutantes espontáneas de <i>Ecc</i> 71 resistentes a tetraciclina	79
10.- Población alcanzada por <i>Ecc</i> 71 y clones mutantes OmpE(-) después de 8 hrs de cultivo y tiempos de generación	86
11.- Producción de exoenzimas de <i>Ecc</i> 71 y clones mutantes OmpE(-).....	88
12.- MICs de la cepa <i>Ecc</i> 71 y clones mutantes	90
13.- Valores de maceración producida por <i>Ecc</i> 71 inoculada en duplicado dentro del mismo tubérculo de papa	95
14.- Porcentajes de maceración exhibidos por los clones mutantes OmpE ⁽⁻⁾ de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 71	97
15.- Comparación entre la virulencia de <i>Ecc</i> 71 y clones mutantes	109
16.- Estabilidad del plásmido pSTP2B1 en el clon 311(5) de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	110

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1.- Esquema de una sección transversal del sistema de doble membrana que envuelve a una bacteria Gram-negativa.....	7
2.- Halos de hidrólisis de polipectato producidos por bacterias, en medio de cultivo Cristal violeta polipectato de sodio	23
3.- Crecimiento de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> en medio de cultivo M-P	24
4.- Microscopía óptica de un corte por tubérculo de papa.	44
5.- Corte por la zona de maceración de un tubérculo de papa provocada por <i>Ecc</i> 71 después de 24 hrs de inoculación	45
6.- Corte por tubérculo de papa en la zona de maceración	46
7.- Morfología de <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> al MEB	47
8.- Maceración en tubérculo de papa al MEB	47
9.- Lesiones de la pared de las células parenquimatosas de tubérculo de papa. ..	48
10.- Efecto de la inoculación de <i>Ecc</i> en un tubérculo de papa	49
11.- Vaciado de zona de maceración en tubérculo de papa	49
12.- Electroforetograma proteínas de ME de <i>E. coli</i> K12, <i>Ecc</i> 71 y <i>S. typhimurium</i> (A). "Immunoblots" con suero anti-OmpC de <i>S. typhi</i> (B) , y anti-OmpF/OmpA de <i>S. typhimurium</i> (C).	51
13.- Perfil de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71, <i>E. coli</i> K12 y <i>S. typhimurium</i> MS1 (A), "immunoblot" contra suero antiporina OmpC de <i>S. typhi</i> (B).	54
14.- Electroforetograma de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71, <i>E. coli</i> K12 y <i>S. typhimurium</i> (A). Densitometría de las proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71 (B). Efecto de la osmolaridad del medio sobre la expresión de proteínas de ME.	57
15.- Electroforetograma de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71. Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la expresión de proteínas de ME.	59
16.- Electroforetograma de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71 (A), "immunoblot" frente a suero antiporina OmpC de <i>S. typhi</i> (B), valores de la razón OmpE/OmpA obtenidos de la densitometría del electroforetograma (C) .Efecto del tipo de medio de cultivo sobre la expresión de proteínas de ME de <i>Ecc</i> 71.	62

17.- Electroforetograma de proteínas de ME de <i>Ecc 71</i> (A); de <i>Ecc 71</i> , <i>Ecc 193</i> y de <i>S. typhi</i> (B); densitometría de las proteínas de ME de <i>Ecc 71</i> cultivada en anaerobiosis y en los medios A1, MP y CL.	65
18.- Electroforetograma de DNA plasmidial pSTP2Kmic, del clon transformante <i>Ecc 71</i> (pSTP2Kmic)	71
19.- Electroforetograma de proteínas de ME separadas en PAGE-SDS al 12,5% (A); y en PAGE-SDS-urea (B). Efecto del gen <i>micF</i> en la regulación de la expresión de porinas de la ME.	73
20.- Perfil de proteínas de ME de clones mutantes <i>OmpE</i> ⁽⁻⁾ de <i>Ecc 71</i>	80
21.- Perfil de proteínas de ME de clones mutantes <i>OmpE</i> ⁽⁻⁾ de <i>Ecc 71</i> , de <i>S. typhimurium</i> <i>OmpC</i> (-) y de sus respectivas cepas parentales.	81
22.- Electroferograma de proteínas de ME de clones mutantes <i>OmpE</i> ⁽⁻⁾ de <i>Ecc 71</i> (A); su análisis en "immunoblots" contra suero anti- <i>OmpC</i> de <i>S. typhi</i> (B); y contra suero anti- <i>OmpF/OmpA</i> de <i>S. typhimurium</i>	83
23.- Curvas de crecimiento de <i>Ecc 71</i> y clones mutantes <i>OmpE</i> ⁽⁻⁾	85
24.- Análisis de productos de PCR, mediante electroforesis en agarosa. Amplificados de DNA de <i>Ecc 71</i> , de clones <i>OmpE</i> (-) y de <i>S. typhimurium</i> MST2497 (A); digestión de algunos de los productos de PCR presentados en (A) , (B)	92
25.- Corte por un tubérculo de papa, mostrando los sectores de maceración producidos por <i>Ecc 71</i> , y clones mutantes <i>OmpE</i> (-) 311 y 19	96
26.- Porcentajes de maceración exhibidos por las mutantes <i>OmpE</i> ⁽⁻⁾ de <i>Ecc 71</i> , inoculadas en tubérculos de papas.	97
27.- Electroforesis del DNA del plásmido pSTP2B1 (A) y de clones transformados con pSTP2B1 (B), en agarosa.	100
28.- Análisis de la digestión de pSTP2B1 y DNA plasmidial del clon 311(5).....	103
29.- Electroferograma de las proteínas de ME del clon transformante 311(5).	104
30.- Electroforetograma de proteína de ME .Expresión de <i>OmpC</i> de <i>S. typhi</i> por el clon 311(5) y 311(51) (A); "immunoblot" frente a suero anti- <i>OmpF/OmpA</i> de <i>S. typhimurium</i>	107
31.- Porcentajes de maceración exhibidos por las mutantes <i>OmpE</i> (-) 311 y 311(5)..	109
32.- Esquema de las construcciones pSTP2B1 (A); y de pSTP2Kmic (B).....	138

ABREVIATURAS

A1	: Medio de cultivo mínimo de sales, de Miller
AA1	: Medio de cultivo mínimo de sales, que contiene agar.
AL	: Agar Luria
APS	: Persulfato de amonio
amp	: Ampicilina
BCIP	: 5 - bromo - 4 - cloro - 3 - indolil fosfato
BSA	: Seroalbúmina de bovino
bp	: Pares de bases nitrogenadas
cam	: Cloranfenicol
cbn	: Carbenicilina
CF-IAA	: Mezcla de cloroformo ~ alcohol isoamílico (24 : 1)
CL	: Caldo Luria
CMC	: Carboximetilcelulosa
CTAB	: Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
CVP	: Medio de cultivo Cristal Violeta- polipectato
DNA	: Ácido desoxiribonucleico
<i>Eca</i>	: <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>
<i>Ecc</i>	: <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
<i>Echr</i>	: <i>Erwinia chrysanthemi</i>
EDTA	: Ácido etilendiamino tetraacético
F.A.A.	: Solución de fijación formalina- ác. acético ~ alcohol.
IAA	: Alcohol isoamílico
IgG	: Inmunoglobulina G
kan	: Kanamicina
kb	: Kilobase
kDa	: KiloDalton
LPS	: Lipopolisacárido
M	: Molar
mA	: miliAmpère
ME	: Membrana externa
MEB	: Microscopía electrónica de barrido
µF	: Micro Faradio
µg	: Microgramo
MIC	: Concentración mínima inhibitoria
micF	: RNA complementario que interfiere RNA mensajero de <i>ompF</i>
µl	: Microlitro
ml	: Mililitro
mM	: Milimolar
mOsm	: Miliosmol
MP	: Medio A1 con trozos de papas.
M_r	: Masa molecular relativa
nal	: Ácido nalidíxico

NB	: Caldo nutritivo (DIFCO)
NBT	: Azul de nitrotetrazolio
nm	: nanómetro
OD	: Densidad óptica
Omp	: Proteína de membrana externa
PCR	: Reacción de polimerización en cadena
PBS	: Solución amortiguadora de fosfato
PMSF	: Fenilmetilsulfonil fluoruro
RNA	: Ácido ribonucleico
RNAsa	: Ribonucleasa
R _r	: Movilidad relativa
rpm	: Revoluciones por minuto
SB	: Amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 6,2 , KCl 100 mM y CaCl ₂ 50 mM
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SOC	: Solución extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl ₂ 10 mM; MgSO ₄ 10 mM; glucosa 20 mM..
TCA	: Ácido tricloroacético
TE	: Solución amortiguadora Tris - HCl 10 mM, pH 8,0 ; EDTA 1 mM.
TEA	: Solución amortiguadora Tris - HCl 40 mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM, ajustado a pH 8.0 con ácido acético glacial.
TEMED	: N, N, N, N' - tetrametil etilendiamina
tet	: Tetraciclina
Tris	: Tris- (hidroximetil) - aminometano.
UV	: Luz Ultravioleta

RESUMEN

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene la capacidad de infectar diversos tipos de plantas, produciendo los cuadros denominados "pudrición blanda" o "pie negro". Esta es una bacteria que posee gran importancia en la economía de un país, por las enormes pérdidas que puede provocar, por ejemplo, en la pudrición de tubérculos de papa en bodega, o bajo tierra, o por pie negro en la planta misma.

Como bacteria Gram-negativa se caracteriza por poseer una membrana externa, por fuera del peptidoglican; constituida por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. Hasta el momento, es escasa la información con que se cuenta, acerca de los constituyentes proteicos de esta membrana en el género *Erwinia*, y del papel que pudiesen tener en la virulencia de estas bacterias.

En esta tesis se determinó la existencia de 4 proteínas mayores en la membrana externa de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc 71), dos de las cuales se comportan como complejos proteicos en su estado nativo, y cuyas masas moleculares aparentes son de alrededor de 37,9 kDa y 40 kDa. Según criterios del comportamiento electroforético en geles de poliacrilamida - SDS o de poliacrilamida - SDS - urea y de su inmunorreactividad frente a antisueros, se ha postulado que la proteína de 40 kDa se comportaría como OmpA y que aquella de 39,7 kDa lo haría como OmpC u OmpF, proteína esta última que fué denominada OmpE.

Los estudios de expresión de estas proteínas frente a distintas condiciones del medio, han indicado que el cambio de osmolaridad del medio es el estímulo más importante en cuanto a la variación en las concentraciones de estas dos

proteínas en la membrana externa, no encontrándose variación en la condición de aerobiosis/ anaerobiosis o entre los rangos de temperatura de 15°C a 28°C. Se introdujo en *Ecc 71*, un plásmido conteniendo el gen *micF* cuyo producto génico fué capaz de reprimir la expresión de OmpE, en condiciones de alta osmolaridad, hecho que estaría demostrando una homología funcional con OmpF de bacterias como *E. coli*, *Salmonella typhi* o *S. typhimurium*.

Se obtuvieron mutantes OmpE⁽⁻⁾ de *Ecc 71*, por recombinación homóloga entre el cromosoma de esta bacteria y un fragmento de DNA cromosómico de *S. typhimurium*, conteniendo una inserción Tn10 en el gen *ompC*. La mutagénesis se realizó por transducción del material genético a *Ecc 71*, mediante el fago P22.

Se ha podido determinar, que la carencia de la proteína OmpE en la membrana externa de *Ecc 71* le disminuye la capacidad de producir pudrición blanda en tubérculos de papa, disminuye el poder de hidrólisis de poligalacturonato de sodio o de carboximetilcelulosa en ensayos in vitro, y les hace adquirir resistencia a antibióticos tales como cefaloridina, cloranfenicol y ácido nalidíxico. Estas mutantes no alteraron su capacidad proteolítica in vitro.

Se realizaron esfuerzos por obtener el retorno al patrón original de virulencia en la mutantes OmpE⁽⁻⁾, y para ello se hizo la transformación de una mutante OmpE⁽⁻⁾, por introducción de un plásmido pSTP2B1 conteniendo el gen *ompC* de *S. typhi*, con la intención de restituir esta proteína en la membrana externa de la bacteria. El clon 311(5), transformado, fué capaz de expresar OmpC de *S. typhi*, pero fué menos virulenta que su cepa de origen, probablemente por alteración de la fisiología de la bacterias debida a que este plásmido es multicopia. Por otro lado, se intentó aislar revertantes naturales, y también se trató de inducir "intercambio de marcas" entre fragmentos de DNA cromosómico que contenían el gen

ompC de *S. typhimurium* o entre el gen *ompC* de *S. typhi* del plásmido pSTP2B1 y el gen *ompC* de *S. typhimurium* conteniendo el inserto Tn10 en el cromosoma de *Ecc* 311(5), procedimientos que no tuvieron éxito, pues no se lograron aislar bacterias que expresaran OmpC de *S. typhi* o *S. typhimurium*.

Los resultados obtenidos a través de esta tesis representan un importante aporte al conocimiento de la constitución proteica de la membrana externa de *Erwinia*, en la identificación y expresión de 2 de las proteínas mayores y su regulación según factores del medio ambiente; así como la posible participación en los mecanismos de virulencia que posee esta bacteria como fitopatógeno. Esta es una contribución al conocimiento, que en los últimos tiempos se ha ido acumulando, en favor del papel que juegan las proteínas mayores de membrana externa en la virulencia de diversos patógenos, estando este estudio dedicado a un fitopatógeno, campo que ha sido poco explorado.

SUMMARY

Bacteria of the Gram-negative genus *Erwinia*, belonging to the family of *Enterobacteriaceae*, are major plant pathogens, which cause economically important damage in plants in the field or after harvest, during storage. This species produce the so called "soft-rot" and "black leg" or stem rot of potatoes, affecting the tubercle and the plant respectively; the soft-rot of pumpkins, chicory, carrots and cucumber as well as of certain ornamental plants like Saint Paulia, Diffenbachia and Poinsettia.

In addition to a cytoplasmic membrane, *Enterobacteriaceae* present an outer membrane which contains phospholipids, LPS and proteins as its major constituents. In contrast to the well characterized outer membrane proteins (OMPs) of *E. coli* and *S. typhimurium*, little is known about *Ecc* OMPs.

In this study, the existence of four major OMPs in *Ecc* is established and the role in virulence of one of these is strongly suggested. Two of these OMPs, having apparent molecular masses of approximately 37, 9 kDa and 40 kDa, behave as protein complexes in their native state. When these two proteins were characterized by SDS or SDS - urea - polyacrylamide gel electrophoresis and immunoreactivity, they appeared homologous to OmpA (the 40 kDa protein) and to the major porins from *E. coli* (the 37. 9 kDa protein). The latter was named OmpE.

The influence of the growth conditions on the composition of the major OMPs of *Ecc* was also analysed. It was found that medium osmolarity has the greater effect on the regulation of OmpA and OmpE. Furthermore, it was found that neither oxygen availability (aerobiosis versus anaerobiosis) at which bacteria

were grown nor temperature (ranging from 15 to 37°C) had a considerable effect on the regulation of protein expression. This conclusion is based on the relative amount of protein shown up in OMPs preparations.

By transformation of *Ecc* 71 with a plasmid containing *S. typhi* Ty2 *micF*, strong repression of OmpE was observed under high osmolarity growth conditions. This is suggesting that OmpE is functionally homologous to OmpF from other members of *Enterobacteriaceae*, such as *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. typhi*.

Ecc 71 mutants, lacking OmpE, were obtained by homologous recombination between *Ecc* chromosome and a DNA fragment from *S. typhimurium* carrying *ompC*: :Tn10. The latter was transduced to *Ecc* 71 via phage P22. This is a very interesting approach to identify homologous genes between genetically well characterized species (*S. typhimurium*) and genetically poorly characterized bacteria, such as *Ecc* 71.

In this work, it is demonstrated that the lack of OmpE appears to be associated to a diminished ability of *Ecc* 71 to produce "soft rot" in potato tubercles. In addition, the strain showed a decreased capacity to hydrolyze sodium polygalacturonate or carboxymethyl cellulose *in vitro*. In contrast, OmpE mutants exhibited an unaltered proteolytic capacity *in vitro*. It was also determined an increased resistance to antibiotics such as cephaloridine, chloramphenicol and nalidixic acid.

Plasmid pSTP2B1 containing *ompC* gene from *S. typhi* was used to transform *Ecc* 71 OmpE⁽⁻⁾ with the aim to revert this mutant to the original virulent activity. However, in spite of that *S. typhi* OmpC was expressed and found in the outer membrane of *Ecc* 71 (clon 311), virulence was not regained. The fact that pSTP2B1 is a multycopy plasmid suggests that overexpression of OmpC might be

causing problems to the normal physiology of *Ecc*. Efforts to obtain revertants of OmpE \leftrightarrow (which is in fact *ompC*: Tn10), by recombination with *S. typhimurium ompC* or *S. typhi ompC* in pSTP2B1, failed in spite of numerous attempts.

This study is the first one to use P22 as genetic tool to characterize major proteins of the *Ecc* outer membrane by establishing genetic homology with a known mutant from *S. typhimurium*. This work is also demonstrating for the first time, that a porin (OmpE) in a plant pathogen which is related to OmpF and OmpC of animal pathogens, plays an important role in the virulence of the bacteria.

INTRODUCCIÓN

Existen muchos tipos de bacterias que viven en las plantas o alrededor de ellas, y que desde el punto de vista de los beneficios o daños producidos pueden corresponder a variadas categorías. Las bacterias que antagonizan con su hospedero y causan una franca enfermedad reciben la denominación de patógenos. Según Mekalanos (1992), el establecimiento de la enfermedad dependerá de la participación de determinantes de virulencia, que incluye a "todos aquellos factores que contribuyen a la infección y que aumentan la severidad de la enfermedad". La virulencia será la expresión cuantitativa de la capacidad patogénica.

Hirano y Upper (1983) definieron como bacterias epifíticas a aquellas que viviendo en la superficie de las hojas pueden ser removidas mediante el lavado con agua, sin embargo, se ha visto que la validez de esta definición puede depender de las capacidades de las bacterias para unirse a la superficie vegetal y no ser removidas por el lavado. De hecho, muchas bacterias patógenas poseen una fase de crecimiento epifítico, es decir, viven en el exterior del vegetal, y cuya duración puede variar considerablemente dependiendo de la especie y de los cambios en las condiciones del ambiente. La distinción entre fase epifítica y fase patogénica de un patógeno de plantas no siempre está clara, las bacterias además de encontrarse en la superficie de las hojas como epifíticas pueden también hacerlo en estomas y lenticelas, donde, después de un cambio en las condiciones ambientales, pueden desencadenar la fase patogénica.

Las bacterias fitopatógenas, son más bien bacterias comunes tales como pseudomonas, enterobacterias, bacillus, agrobacterias, micoplasmas y actinomicetes, que son capaces de causar enfermedades en prácticamente todos los grupos de plantas.

Entre éstas se encuentra el género *Erwinia*, algunas de cuyas especies son capaces de producir la enfermedad llamada "podrición blanda", en una variedad de plantas, y tubérculos de papas (*Solanum tuberosum*). Los estudios morfológicos y fisiológicos de estas bacterias, las han situado taxonómicamente dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos Gram negativos, móviles mediante flagelos peritricos, anaerobios facultativos, los que en su mayoría son capaces de vivir en un medio de cultivo basal de sales y glucosa; todos los miembros de este género son fermentadores de tipo "ácido - mixto" (Starr y Chatterjee, 1972).

Las especies del género *Erwinia* pertenecientes al grupo *carotovora*, son en general denominadas "bacterias de podrición blanda": *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc); *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca); y *E. chrysanthemi* (Echr). Las tres variedades de *Erwinias* nombradas anteriormente difieren entre ellas con respecto a sus temperaturas óptimas de crecimiento. Mientras *Eca* crece a 27°C, *Ecc* lo hace entre 28 - 30 °C, y *Echr* de 34 - 37°C. Por otra parte, *Eca* no es capaz de crecer a 37°C, y muchas *Ecc* son incapaces de hacerlo a 39°C, mientras se ha visto que *Echr* puede hacerlo por sobre los 45°C (Pérombelon y Kelman, 1980).

En la naturaleza, las sustancias de tipo pécticas existen solamente en las paredes celulares de plantas, generalmente como un material estructural insoluble. Las bacterias fitopatógenas, en su contacto con estas sustancias pécticas han desarrollado habilidades degradativas diversas.

La característica que distingue a las bacterias de podrición blanda de otras especies de *Erwinia*, es su capacidad de producir grandes cantidades de pectinasas lo que las capacita para macerar el tejido parenquimatoso de una amplia variedad de especies vegetales; tales como, repollo, lechuga, remolacha, plantas de papas y tubérculos de papas (Starr y Mandel, 1950; Dickey, 1979, 1981), también producen

celulasas, proteinasas, y fosfatidasas (Collmer y Keen, 1986). La pudrición blanda producida por *Erwinia* ha llegado a ser un sistema modelo para el estudio de la patogenicidad bacteriana. Aún cuando la enfermedad se ha correlacionado directamente con la producción y secreción de pectato liasa, la producción de proteasas y celulasas, las que no maceran el tejido vegetal, puede sin duda, contribuir a la virulencia por acción sinérgica con las pectinasas, provocando el stress de las células y permitiendo así que las bacterias aprovechen las fuentes de carbono y nitrógeno disponibles a través de la degradación de los compuestos poliméricos (Robert-Baudouy, 1991). Algunos autores han sugerido que todas o muchas de estas enzimas actúan en un sistema de consorcio, para producir el síndrome de la maceración (Bateman y Millar, 1966; Beraha y Garber, 1971), mientras los resultados de otros investigadores sugerirían que podría bastar una sola enzima para cumplir este objetivo (Keen y cols. 1984).

En erwinias se ha encontrado la producción de isoenzimas para una variedad de enzimas macerantes (Garibaldi y Bateman, 1971), las que, además de mostrar distintas velocidades de acción, y distinta afinidad según la integridad del tejido susceptible, muestran diferente habilidad de maceración de tejidos de diferentes especies vegetales, lo cual sugiere un importante papel en la especificidad de los hospederos.

Dentro del grupo *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* posee una amplia distribución geográfica, presentándose como patógeno para un amplio rango de plantas tanto en zonas tropicales como templadas. Es una bacteria que se encuentra comúnmente en las aguas de riego de los cultivos de papas (Cappaert y cols. 1988), en los suelos (Powelson y Apple, 1984), en la superficie de los tubérculos, así como en el follaje de las plantas (De Boer, 1983). De acuerdo con la idea de Leben (1965), quien ha sugerido que muchas bacterias fitopatógenas persisten en una fase epifítica en plantas asintomáticas, y que la enfermedad sobreviene cuando se

desarrollan condiciones ambientales apropiadas, es que esta bacteria ha sido catalogada como "patógeno oportunista". La enfermedad en que la bacteria ataca la parte basal del tallo de las plantas de papas, se ha denominado "pié negro", y puede ser ocasionada indistintamente por *Ecc*, *Eca* o *Echr*. El "pié negro" ha sido invariablemente asociado a la enfermedad del tubérculo semilla, aún cuando se ha visto que esto no se cumple en el 100% de los casos.

Los tubérculos de papas, son infectados generalmente por las lenticelas, aún cuando se puede iniciar la maceración del tejido de igual manera si es que las bacterias se han introducido por heridas o por el extremo del estolón. Las papas en bodegaje, una vez iniciada la infección, muestran pequeños bolsillos de tejido macerado, los que rápidamente se van ampliando hasta que terminan en una pudrición masiva del tubérculo.

Estas bacterias están presentes normalmente en la superficie de los vegetales, o como infecciones latentes en muchos cultivos. Las condiciones fisiológicas de las bacterias cuando se encuentran "inactivas" sobre o dentro de las plantas no se conocen, como tampoco, de qué manera se rompe el delicado balance entre la actividad metabólica latente de las bacterias y la resistencia de los tejidos del hospedante. En el caso de tubérculos de papa en bodega, se sabe que el cambio en ciertas condiciones ambientales, tales como: la formación de un ambiente anaeróbico, acumulación de humedad sobre los tubérculos y la elevación de la temperatura, puede romper la latencia y provocar el crecimiento de la población microbiana, y la muerte del tejido vegetal (Maher y Kelman, 1983). El gran desarrollo y daño producido por estas bacterias sobre los tubérculos de papas, en condiciones de baja tensión de oxígeno, es atribuido, más bien, al efecto inhibitorio que tiene la baja concentración de O_2 sobre los mecanismos

de defensa del tubérculo, que a un aumento de velocidad en el metabolismo bacteriano (De Boer y Kelman, 1978).

Si la superficie del tubérculo de papa se encuentra cubierta por un film de agua, ésta será absorbida, lo cual provocará el aumento de turgencia de las células adyacentes a las lenticelas y que llevará a la ruptura de esta capa de células, las que presentan escasa suberización (Pérombelon y Lowe, 1975). Una fase líquida continua se establece entre el cortex y las lenticelas, y las bacterias alojadas en estas últimas pueden entonces penetrar hacia el cortex. Tanto la disponibilidad de nuevos nutrientes, así como la reducción de la resistencia del tubérculo de papa bajo condiciones anaeróbicas, permitirá el establecimiento de un foco de pudrición. Cualquier ruptura de la peridermis del tubérculo de papa, posibilitará la entrada de bacterias a su interior, y si después de ello, se dan las condiciones de anaerobiosis, se podrán desarrollar los procesos de infección y posterior maceración (Pérombelon y Kelman, 1980).

El efecto de la temperatura en la patogenicidad de *Ecc*, sería atribuida más bien a que su velocidad de crecimiento es mayor a 28°C que a 15°C, ya que en lo que concierne a síntesis de enzimas pécticas, no se ha encontrado diferencia en cuanto a la cantidad producida a una u otra temperatura (Pérombelon y Kelman, 1980).

El estudio de las enfermedades en tubérculos o plantas de papas ha ido en aumento en los últimos años, motivado por varios hechos: por una parte, que ellas se encuentran ubicadas entre las cuatro primeras plantas de mayor importancia económica en el mundo; que las pérdidas asociadas a enfermedades de papas por bacterias, pueden ser tan altas como del 25% de la producción mundial (cerca de US\$ 4 billones anuales) variando de país en país según las condiciones climáticas, condiciones de desarrollo y bodegaje a que son sometidas; y que estas plantas poseen una enorme

plasticidad en su crecimiento, lo que facilita su manipulación genética, y la obtención de plantas resistentes tanto a enfermedades bacterianas como fúngicas (Destéfano- Beltrán y cols., 1990).

Uno de los mecanismos de patogenicidad o virulencia mejor entendidos, en relación a patógenos de plantas, es el de producción de pectinasas por *Erwinias* spp. de pudrición blanda (Collmer y Keen, 1986; Kotoujansky, 1987). Sin embargo, muchos otros factores han sido detectados en los últimos tiempos, los que estarían involucrados en la reducción de patogenicidad y virulencia de estas bacterias, como por ejemplo: la alteración de la quimiotaxis y motilidad por sistemas defectuosos en el ensamblaje de proteínas flagelares (Pirhonen y cols. 1991; Mulholland y cols., 1993.); o la alteración de elementos de la envoltura celular. La envoltura celular está mostrando ser un factor importante en la virulencia de estas bacterias: como el caso de bacterias resistentes a ciertos fagos o bacteriocinas que muestran reducción en su virulencia en la infección a plantas de Saint Paulia o papas, por alteración del LPS (Schoonejans y cols. 1987); la alteración de componentes de membrana externa que tienen relación con las moléculas de LPS y que impiden que LPSs con cadenas laterales largas puedan unirse con firmeza a la membrana externa (Tharaud y cols. 1994); otro factor relevante resulta de la alteración de los sistemas de transporte de hierro en la bacteria que involucra producción de sideróforos y sistema receptor específico de membrana (Expert y Toussaint, 1985; Enard y cols., 1988; Persmark y cols., 1989; Ishimaru y Loper, 1992). También es afectada la virulencia en el caso que se altere el sistema de exportación de proteínas al medio externo, demostrado con el aislamiento de mutantes *out*. La maquinaria de exportación de exoenzimas, está formada por varias proteínas codificadas en el operon *out* y que permiten la secreción de pectinasas y celulasas a través de la membrana externa (Ji y cols., 1989) .

El género *Erwinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y como tal, sus miembros se caracterizan por ser bacterias Gram negativas, y estar cubiertos por una membrana externa (ME), una estructura membranosa adicional presente por fuera de la membrana citoplásmica y el peptidoglicán. Por su ubicación, esta estructura tiene un papel fundamental en la relación que poseen estos microorganismos con su medio ambiente, siendo su función principal, la de servir de barrera de permeabilidad a moléculas tóxicas que existen en el medio externo (Osborn y Wu, 1980; Nikaido y Vaara, 1985). Como se muestra en el esquema de la figura 1, esta membrana es una estructura de tipo asimétrica, ya que los componentes que enfrentan el

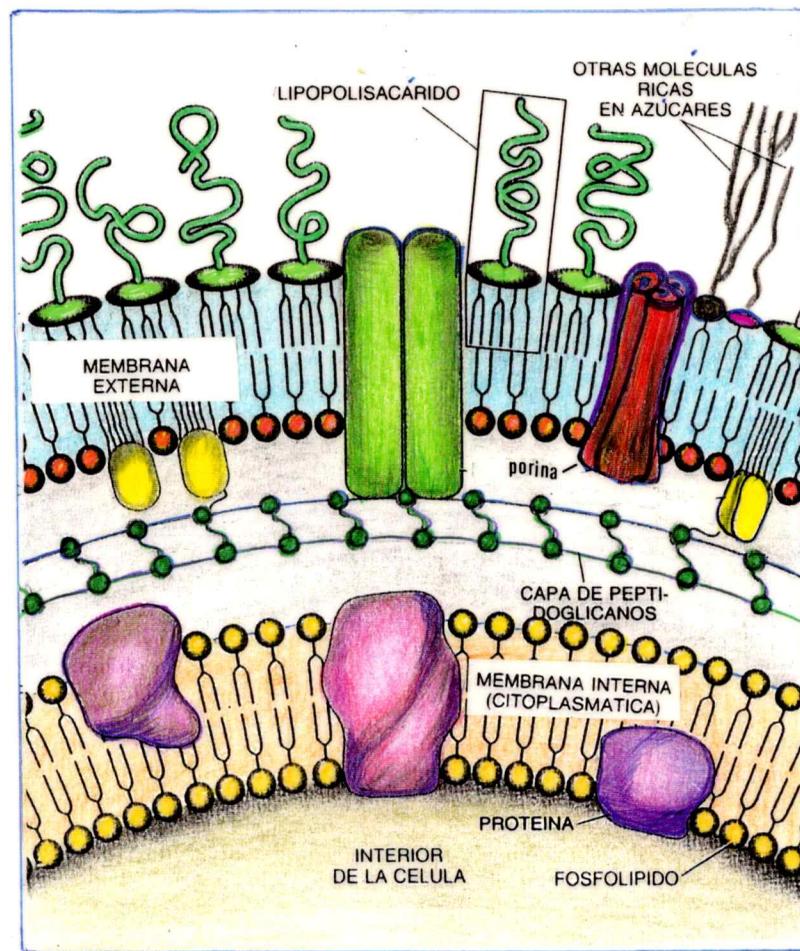


Fig. 1 Esquema de una sección transversal del sistema de doble membrana que envuelve a una bacteria Gram - negativa. (Adaptado desde Rietschel y Brade, 1992.)

medio externo son diferentes a aquéllos que lo hacen hacia el espacio periplásmico, en donde se encuentra el peptidoglicán. Estudios realizados en *Escherichia coli* indican que la monocapa interna está compuesta principalmente por fosfolípidos neutros, fosfatidiletanolamina (81%), y pequeñas cantidades de fosfolípidos cargados negativamente, como fosfatidilglicerol (17%) y cardiolipina (1,6%), (Benz, 1985; Nakae, 1986).

La monocapa externa, por su parte, está constituida por polisacáridos (LPS) y proteínas. El LPS, también llamada endotoxina bacteriana, está formada por el Lípido A que se encuentra inmerso en la ME, y el polisacárido que se proyecta hacia el ambiente compuesto por una porción interna de azúcares la que se une al Lípido A y una cadena constituida por 20 a 40 unidades repetitivas de hasta unos 8 azúcares, los cuales varían de una especie bacteriana a otra (Raetz y cols., 1991). La composición proteica de la ME es relativamente simple, representada por unas 3-4 proteínas presentes en alta concentración, las llamadas "proteínas principales"; y otras pocas presentes en muy baja concentración (Nikaido y Vaara, 1985; Benz, 1988).

Estas bacterias, sin embargo, deben incorporar nutrientes y eliminar desechos al medio ambiente. Gran parte de este flujo a través de la ME lo llevan a cabo por canales de proteínas, y al parecer la mayor parte de las proteínas encontradas en esta membrana parecen corresponder a proteínas formadoras de canales (Nakae y Nikaido, 1975; Nakae, 1986), dedicadas a la incorporación de nutrientes; aún cuando existen otras que participan en la exportación de proteínas (Wandersman, 1992), o en la mantención de la estructura de la ME, como es el caso de la lipoproteína de Braun de 7,2 kDa de peso molecular (Braun, 1975).

Las proteínas formadoras de canales, denominadas porinas, han atraído la atención de los investigadores por la gran adaptabilidad que le confieren a las

bacterias que las poseen, frente a diferentes condiciones del medio, y ello debido a, modulación mediante sistemas de regulación que gobiernan su presencia en la ME.

Las porinas han sido caracterizadas en un gran número de bacterias (Hancock, 1987). Las porinas presentes en *Escherichia coli* son OmpF (Outer membrane protein F) (32,7 kDa) (Inokuchi y cols., 1982), OmpC (36 kDa) (Kawaiji y cols., 1979; Mizuno y cols., 1983) y OmpA (35 kDa) (Sugawara y Nikaido, 1992); mientras que *Salmonella typhimurium* además de OmpF (39,3 kDa), OmpC (39,8 kDa) y OmpA (33 kDa), sintetiza OmpD (38 kDa) (Tokunaga y cols., 1979; Benz y cols., 1980).

Estas porinas son inespecíficas en cuanto al tipo de molécula hidrofílica que difunde por ella, requiriéndose que sean de tamaño molecular menor de 600 daltons y de preferencia de tipo catiónico (Benz y Bauer, 1988; Nikaido y Vaara, 1985). Existe otra porina en estas dos bacterias, PhoE, cuya expresión es inducida en condiciones de carencia de fosfatos (Argast y Boos, 1980; Bauer y cols., 1985), la cual, aunque se comporta como una porina de difusión general, posee una marcada preferencia por compuestos de tipo aniónico, especialmente fosfatos y compuestos de tipo fosforilado (Kortnerland y cols., 1982). Por otra parte, también existen otras porinas a las que se ha llamado "de poro específico", una de cuyas representantes es la porina LamB, la cual presenta afinidad por maltosa y maltodextrinas.

Las porinas, como la mayoría de las proteínas exportadas por la célula, son sintetizadas como precursores que poseen un péptido señal de 20 a 21 aminoácidos (Mizuno y cols., 1983; Inokuchi y cols., 1982; Overbeeke y cols., 1983; Randall y cols., 1987). Dicho péptido señal les permite atravesar la membrana interna, en donde son procesadas por la peptidasa señal que lo corta, liberando las porinas al periplasma, insertándose posteriormente en la membrana externa.

Se ha comprobado, que la composición de proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, es modulada por condiciones del medio ambiente tales como: temperatura, osmolaridad, componentes del medio de cultivo, disponibilidad de oxígeno, entre otras. La síntesis de las porinas OmpC y OmpF en *E. coli* es regulada por la osmolaridad del medio, de manera tal, que OmpC es expresada preferentemente cuando las células son crecidas en medios de alta osmolaridad, condición en que se expresará pobremente OmpF; si la osmolaridad del medio disminuye, entonces disminuirá la síntesis de OmpC e irá aumentando la de OmpF (van Alphen y Lugtenberg, 1977; Kawaiji y cols., 1979). La regulación de los genes *ompF* y *ompC* por osmolaridad, depende de la actividad de los productos génicos del operón *ompB*, compuesto por los genes *ompR* y *envZ* (Forst e Inouye, 1988; Mizuno y Mizushima, 1990; Pratt y Silhavy, 1995). La proteína OmpR, tiene afinidad por DNA y se une específicamente a las secuencias promotoras de los genes *ompF* y *ompC*, en una región ubicada a 90 pares de bases, aproximadamente, previa al sitio de inicio de la transcripción (Forst y cols., 1989). La proteína EnvZ se localiza en la membrana interna, y está a cargo de la detección de cambios en la osmolaridad del medio, información que transmite a OmpR mediante fosforilación, la que activa selectivamente la expresión de los genes *ompF* y *ompC* mediante la unión a las regiones promotoras (Forst y cols., 1989).

Según trabajos de Karlsson y cols., 1991, en *Ecc* existiría un operón funcionalmente análogo a *ompR - envZ* de *E. coli* al que han denominado *ompRS*, el cual sería requerido para la producción de una proteína de membrana externa de *Ecc*. Sin embargo, estos autores sugieren que la presencia de esta proteína de membrana externa no sería importante para la virulencia de la bacteria, sin mostrar resultados al respecto.

En el caso de la regulación por temperatura, la expresión de OmpF es mayor que OmpC a temperaturas de crecimiento por debajo de 37°C, mientras ocurre lo contrario si ésta es igual o mayor que 37°C. La regulación de porinas en este caso se debe a la participación del gen denominado *micF* (Mizuno y cols., 1984; Coleman y cols., 1984; Green y cols., 1986; Delihias, 1995) el cual está involucrado en la regulación negativa post-transcripcional de *ompF*. Este gen se encuentra ubicado hacia la región 5' previa al gen *ompC*, pero en sentido opuesto a éste, y su expresión lleva a la formación de un mRNA complementario a la parte 5' inicial del mRNA de *ompF* (incluyendo la secuencia de Shine - Dalgarno) el que ha sido denominado "Messenger RNA interfering complementary RNA" (*micF*). Este RNA al unirse a las secuencias complementarias en el mRNA de *ompF* bloquea la traducción de éste y por lo tanto disminuye la síntesis de OmpF. La transcripción del gen *micF* es estimulada 10 veces a temperaturas de 37°C o por sobre ella, mientras que la estimulación sería sólo de 5 veces frente a aumento en la osmolaridad del medio (Pratt y cols., 1996).

Se ha comprobado que la tensión de oxígeno existente en el medio de cultivo de las bacterias, puede ser un factor importante en la regulación de las proteínas expresadas por éstas. En el caso de *S. typhimurium* se ha probado que en anaerobiosis se reprime la síntesis de una de las proteínas de ME (Schiemann y Shope, 1991) y la bacteria presentará un fenotipo invasivo (Ernst y cols., 1990). En el caso de *Salmonella typhi*, la anaerobiosis es una de las principales variables que enfrenta este patógeno dentro de su hospedero, condición que produce la inducción y represión de proteínas de su ME (Obreque, 1992); similares resultados se han encontrado con *Neisseria gonorrhoeae* (Clark y cols., 1987).

Muchas bacterias Gram-negativas, entre otras *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp., han demostrado

gran habilidad para responder a las fluctuaciones en las concentraciones de ciertos solutos de su ambiente, por modulación de la expresión de grupos específicos de genes (Ronson y cols., 1987).

La interacción entre hospedero y patógeno durante una enfermedad, es un campo de batalla dinámico, en donde las hábiles estrategias del microorganismo por sobrevivir y multiplicarse, se encuentran frente a las defensas del hospedero. Se han acumulado muchas evidencias que indican que los patógenos bacterianos han desarrollado una serie de sistemas de transducción de señales altamente sofisticadas, que controlan la expresión coordinada de factores de virulencia (Lamb y cols., 1989; Mekalanos, 1992).

Se ha podido constatar que en *E. carotovora* y *E. chrysanthemi*, las enzimas que degradan pectinas son inducidas y liberadas en respuesta a los productos de degradación de estos mismos polímeros (Tsuyuma y Chatterjee, 1984; Chatterjee y cols., 1985) y que la aparición secuencial de diferentes polisacáridos durante el crecimiento de estas bacterias en las células vegetales servirían como inducción para la producción de diferentes enzimas, a medida que la bacteria se va internando en el hospedero. Se ha establecido que *E. chrysanthemi* produce enzimas nuevas y adicionales *in planta* (Kelemu y Collmer, 1993; Beaulieu y cols., 1993). Otros investigadores (Corbin y cols., 1987) han postulado que los fragmentos de oligogalacturónidos de la pared celular vegetal son serios candidatos a señales de estrés celular, ya que ellos son potentes inductores de los genes de inhibición de proteasas, aún cuando se ha llegado a determinar que no se mueven del sitio de la lesión (Baydoun y Fry, 1985), indicando esto, que probablemente la función de ellos esté restringida a la activación local.

El éxito de las erwinias del grupo *carotovora* como patógenos de plantas, depende en gran medida de su capacidad de secretar enzimas hacia el medio

externo; en *E. chrysanthemi*, se ha establecido que estas bacterias requieren de un aparato de secreción accesorio para la exportación de pectinasas y celulasas, la vía dependiente de Sec, la cual se encarga de la traslocación de enzimas a través de la membrana interna y luego otra vía de exportación sería utilizada para atravesar la membrana externa (Pugsley, 1993). Murata y cols. (1990), han informado la existencia de un grupo de genes *out* que son capaces de complementar a mutantes de secreción de *Ecc*, lo que estaría indicando la importancia que tiene para la bacteria el contar con un sistema que le permite traslocar exoenzimas a través de la membrana externa hacia el medio ambiente. En *E. chrysanthemi*, se estableció que la secreción de exoenzimas requería de al menos 4 genes *out* (He y cols, 1991), y 8 genes *out* adicionales (Lindeberg y Collmer, 1992), para el transporte a través de la ME. La secuencia de alguno de estos genes muestra una alta homología con genes del sistema *pul* de *Klebsiella oxytoca* y con otros genes involucrados en procesos de secreción en bacterias Gram-negativas, lo cual estaría indicando que los componentes de esta vía de secreción han sido conservados durante la evolución (Lory, 1992).

Pues bien, este sistema de secreción de enzimas, cuenta con proteínas que se encuentran insertas en membranas, y su regulación, como en otros sistemas mencionados antes, se ha comprobado depende de la presencia del sustrato en el medio (Lindeberg y Collmer, 1992).

Son muchos los casos en que se ha demostrado cambios en la composición de proteínas de la membrana externa, provocados por señales del medio ambiente que inciden en variaciones de la expresión de tales proteínas, y que les permitiría a las bacterias mostrar mayor virulencia en sus hospedantes. Así, es el caso de *V. cholerae* que muestra variaciones en una proteína de ME-asociada-a-virulencia, cuyo control transcripcional depende de las concentraciones de hierro presente en el medio

ambiente (Goldberg y cols., 1990). En el fitopatógeno, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* W3C105, hay evidencias que indican la existencia de un sistema funcional de adquisición de hierro, sistema que cuenta con la producción de aerobactina y un receptor de aerobactina-Fe, una proteína de 80 kDa en la ME, ambos componentes regulados por la cantidad de hierro presente en el medio (Ishimaru y Loper, 1992). En *Erwinia chrysanthemi* se han aislado una serie de mutantes resistentes a bacteriocinas, incapaces de producir pudrición blanda en plantas de Saint Paulia. Este hecho ha sido correlacionado con la desaparición de uno a tres polipéptidos de ME de pesos moleculares entre 80 a 90 kDa, cuya producción en las cepas silvestres es estimulada en forma importante bajo condiciones de limitación de hierro (Expert y Toussaint, 1985). En *Chlamydia* spp., se ha detectado la existencia de varias proteínas de membrana externa ricas en cisteína, incluyendo la porina principal, cuyos residuos cisteína pueden reducirse u oxidarse, dependiendo de las condiciones del ambiente, lo que le permite abrir o cerrar poros en su superficie, controlando la permeabilidad a los nutrientes. En otras palabras, este microorganismo puede detectar el potencial oxidativo de su medio y establecer de ese modo si se encuentra en el medio intra o extracelular (Bavoil y cols., 1984). En *Bordetella pertussis* se ha detectado un grupo de genes, los genes *vag* (*vir*-activated genes) cuya expresión es afectada por señales del medio en un fenómeno llamado modulación antigénica, siendo la expresión máxima en ausencia de $MgSO_4$ o de ácido nicotínico. Uno de estos genes codifica para una proteína del tipo porina, OmpQ.

Se ha encontrado que la mutación de *ompR*, un gen que junto con *envZ* codifica un sistema regulatorio de dos componentes que responde a osmolaridad en *S. typhimurium*, afecta la virulencia de la bacteria, aún cuando el efecto fue sólo parcialmente explicado por la pérdida de las porinas OmpF y OmpC (Chatfield y cols., 1991).

Como estos, existen muchos otros antecedentes en la literatura, que apoyan la idea que las bacterias patógenas deben recibir mensajes desde el medio ambiente, que les permitan adaptar su fisiología y así provocar la enfermedad. En el caso de *Erwinia carotovora* debería cumplirse este patrón, ya que se sabe que bajo ciertas condiciones ambientales la bacteria va a desarrollar la enfermedad en su hospedero. Si además se toma en cuenta que la bacteria se comunica con el medio ambiente, a través de su membrana externa, se comprenderá que el estudio de esta estructura será clave para comprender las adaptaciones que sufre y la importancia de sus componentes en la transformación de este organismo desde un estado epifítico a uno patógeno .

Se propone como hipótesis de trabajo:

“Entre los constituyentes de membrana externa de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, existen proteínas que serían fundamentales en el establecimiento del estado patogénico en el tubérculo de papa; proteínas que son reguladas por las condiciones ambientales y cuya alteración provocaría cambios en la virulencia desarrollada por la bacteria.”

Objetivo General:

Determinar la participación de componentes de la estructura proteica de la membrana externa, en la capacidad patogénica de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* sobre tubérculo de papa .

Objetivos específicos:

- 1.- Producir la maceración de tubérculo de papa por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71 y caracterizar el tipo de lesión a nivel celular.
- 2.- Determinar el perfil de proteínas de membrana externa de *Ecc* 71 y las variaciones que presenta éste, cuando las bacterias se enfrentan a diferentes condiciones ambientales como temperatura, carencia de oxígeno, medios de cultivo y presencia de sustrato natural (tubérculo de papa).
- 3.- Obtener mutantes de *Ecc* 71 en genes que codifican para las proteínas de membrana externa mediante recombinación homóloga y caracterizarlas fenotípicamente.
- 4.- Determinar la virulencia de las mutantes, según el grado de maceración producido después de su inoculación en tubérculos de papas

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1 Cepas , fagos y plásmidos

TABLA 1. Cepas bacterianas

Cepas bacterianas	Caracteres fenotípicos y genotípicos	Fuente
<i>Erwinia carotovora</i>		
subsp. <i>carotovora</i>		
<i>E.c.c.</i> 71	Silvestre, serogrupo III	Gentileza de A.K. Chatterjee. (Zink y cols., 1984)
<i>E.c.c.</i> 193	Silvestre, serogrupo XI	Idem. a anterior.
<i>E.c.c.</i> 311	<i>E.c.c.</i> 71 mutante <i>OmpE</i> ⁻ , <i>tet</i> ^R	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 19	<i>E.c.c.</i> 71 mutante <i>OmpE</i> ⁻ , <i>tet</i> ^R	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 20	<i>E.c.c.</i> 71 mutante <i>OmpE</i> ⁻ , <i>tet</i> ^R	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 22	<i>E.c.c.</i> 71 mutante <i>OmpE</i> ⁻ , <i>tet</i> ^R	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 311(5)	<i>E.c.c.</i> 311 (pSTP2B1) <i>tet</i> ^R , <i>amp</i> ^R	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 311(51)	<i>E.c.c.</i> 311(5) "curada"	Este estudio
<i>E.c.c.</i> 71(pSTP2Kmic)	<i>E.c.c.</i> 71 lleva pUC- <i>micF</i> <i>S.typhi</i> , <i>amp</i> ^R	Este estudio
<i>Escherichia coli</i>		
K12	Silvestre	Dr. G. Mora*
K12(pSTPKmic)	K12 lleva pUC- <i>micF</i> <i>S.typhi</i> , <i>amp</i> ^R	Este estudio
JM109(pSTP2B1)	Cepa con pUC19 - gen <i>ompC</i> de <i>S. typhi</i> , <i>amp</i> ^R	Ref. Zaror, 1989.**
JM109(pSTP2Kmic)	Cepa con pUC19 - gen <i>micF</i> de <i>S. typhi</i> , <i>amp</i> ^R	Ref. Zaror, 1989.**
MS4105	<i>ompF</i> : : Tn5, <i>kan</i> ^R	Dr. G. Mora*
<i>Salmonella typhimurium</i>		
MST 2944	<i>ompD</i> :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Dr.G.Mora*
MST 2947	<i>ompC</i> 396 :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem. anterior
MST221	<i>guaB</i> 544 :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem anterior
MST264	<i>thr</i> 557 :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem. anterior
MST265	<i>leu</i> 1151 :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem. anterior
MST297	<i>tyrA</i> :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem. anterior
MST300	<i>glyA</i> :: Tn 10, <i>tet</i> ^R	Idem. anterior
<i>Salmonella typhi</i>	Silvestre	Dr. G. Mora.*

* Laboratorio de Microbiología, Fac. C.C.B.B., P.U.C.

**Laboratorio de Bioquímica, Fac. C.C.B.B., P.U.C.

TABLA 2. Fago y plásmidos

Fago y plásmidos	Caracteres	Fuente
Fago P22	HT105/1, <i>int</i> - 201	Dr. Mora*
pSTP2B1	gen <i>ompC</i> de <i>S. typhi</i> , fragmento <i>Bgl</i> II, clonado en pUC19 (amp ^R)	Zaror, 1989.**
pSTP2Kmic	gen <i>micF</i> de <i>S. typhi</i> , fragmento <i>Kpn</i> I con el inicio del gen <i>ompC</i> de <i>S. typhi</i> , clonado en pUC19 (amp ^R).	Zaror, 1989.**

* Laboratorio de Microbiología, Fac. C.C.B.B., P.U.C.

** Laboratorio de Bioquímica, Fac. C.C.B.B., P.U.C.

1.2 Sueros antiproteínas de membrana externa.

Se utilizaron dos antisueros proporcionados por el Dr. Alejandro Venegas, Laboratorio de Bioquímica, Fac. C.C.B.B., P.U.C. Un suero policlonal anti proteína OmpC de *S. typhi*, obtenido por inoculación en conejos, de proteína OmpC de *S. typhi* purificada a partir de la banda correspondiente de PAGE-SDS ; y un suero policlonal anti proteínas OmpF y OmpA obtenido de la misma manera que el anterior.

1.3 Tubérculos de papas.

Todos los tubérculos de papas, de la variedad *Desirée* utilizados tanto para los ensayos de maceración, como en medios de cultivo, fueron adquiridos en Supermercados, cuidando que tuviesen aspecto sano, sin cortes ni manchas.

1.4 Reactivos químicos

De BBL , Microbiology Systems Decton Dickinson & Co. : Sistema de producción de ambiente anaeróbico en sobres.

De BioLabs, New England, Mass., EE.UU. : DNA de fago λ digerido con Hind III y DNA de ϕ X174 cortado con Hae III.

De BioRad : bis - acrilamida.

De BRL : enzimas de restricción, anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina.

De Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU. : agar-agar, agar citrato, agar lactosado, agar McConkey, agar maltosa, agar manitol, agar sacarosa, caldo glucosado, caldo nutritivo, caldo sorbitol, caldo urea, caldo Vogues Proskauer, extracto de levadura, Triptona.

De Merck, Darmstadt, Alemania : ácido acético, ácido clorhídrico, alcohol isoamílico, alfa naftol, azul de bromotimol, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, citrato trisódico anhidro, cloroformo, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de zinc, cristal violeta, etanol absoluto, fenol, Folin- Ciocalteau, formalina, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de sodio, fosfato dibásico de sodio, glicerol, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, isopropanol, metanol, N,N-dimetilformamida, Rojo Congo, Rojo de metilo, sulfato cúprico pentahidratado, sulfato de amonio, sulfato de magnesio heptahidratado, tartrato de sodio.

De Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.: ácido fusárico, ácido nalidixico, ácido tricloroacético, α -metilglucósido, agarosa (Low EOF), ampicilina, azul de Coomassie, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, bromuro de etidio, carbenicilina, carboximetilcelulosa (CMC), cefaloridina, celobiosa, cloranfenicol, CTAB,

EDTA, eritromicina, glicina, inositol, gelatina, glicina, glucosa, kanamicina, L-leucina, lisozima, marcadores de masa molecular de proteínas preteñidos SDS-7B, nitrato de sodio, persulfato de amonio, poligalacturonato de sodio, rafinosa, RNasa, sacarosa, seroalbúmina de bovino (BSA), SDS, TEMED, L-tirosina, tetraciclina, L-treonina, Tris-base, Tween 20, Tritón X-100, azul xilencianol.

De Pierce, Rockford, Illinois, USA.: urea Sequanal Grade.

De Polaroid, Cambridge, MA, EE.UU.: películas Black and White 667.

De Promega, Life Technologies, Biotec. EE.UU.: ProtoBlot System (BCIP, 5 bromo-4-cloro-3-indolil fosfato; NBT, azul de nitrotetrazolio).

De Schleider & Schuell, Dassel, Alemania : filtros estériles de nitrocelulosa con poros de 0,45 mm; de 0,2 mm , desechables.

De Whatman, Inglaterra : papel filtro 3MM.

2.- MÉTODOS

2.1 Crecimiento y mantención de las cepas.

Las cepas, tanto nativas como transductantes o transformantes de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), fueron crecidas y mantenidas normalmente en el Medio Mínimo de Sales A1 (Miller, 1977) (K_2HPO_4 , 10,5 g; KH_2PO_4 , 4,5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g; Citrato de Sodio x $2H_2O$, 0,5 g, por litro, al cual después de esterilizado se le agregó 1 ml de una solución de $MgSO_4$ x $7H_2O$ 1 M y 10 ml de glucosa 20%). Las cepas de *Escherichia coli* o de *Salmonella* fueron crecidas en Caldo Luria (CL) (triptona, 10 g; NaCl, 5 g; extracto de levadura, 5 g , por litro) y fueron mantenidas en Agar Luria (AL), el mismo medio de cultivo anterior, al cual se le agregó 1,5 % de agar .

El cultivo de las cepas de *Erwinia* fue generalmente a 28° C, mientras el de las cepas de *Escherichia* y *Salmonella* fue a 37°C.

La conservación de las cepas por tiempo prolongado se hizo en medio de cultivo 2YT (triptona, 16 g; extracto de levadura, 10 g; NaCl, 5 g, por litro) con 50% de glicerol estéril y a temperatura de ~ 20°C.

2.2 Determinación de características bioquímicas y fisiológicas de las cepas.

2.2.1 Fuente de carbono: Los ensayos para determinar la utilización de sustratos como única fuente de carbono se realizaron en el Medio A1, al cual se le agregó el sustrato en estudio en concentración del 1%. Los resultados fueron registrados como crecimiento positivo o negativo.

2.2.2 Producción de ácidos: Se utilizaron los medios de cultivo Difco (Detroit, Michigan, EE.UU.) ya sea en sólido o en líquido, en los que se observó el cambio de color del indicador de pH, después del crecimiento bacteriano.

2.2.3 Hidrólisis de gelatina: Se registró el resultado como positivo cuando el cultivo bacteriano fué capaz de licuar el medio que contenía gelatina (Sigma Chemical Co.) al 10 % en Caldo Luria.

2.2.4 Crecimiento en NaCl, 5%: Se realizó en Caldo Nutritivo (Difco) suplementado con 5% de NaCl.

2.2.5 Motilidad: Se verificó por observación de preparaciones frescas al microscopio, y por crecimiento de las cepas en el medio de Agar Blando para motilidad (Swarm

Agar) según Wolfe y Berg (1989), preparado en Medio A1 al 0,3% de agar. Las cepas se crecieron en Medio A1 hasta una D.O.₆₀₀ de 0,3 unidades de absorbancia, y colocadas en volúmenes de 5 ml sobre la superficie del agar preparado en placas Petri, incubadas hasta por 5 días a 28°C en cajas cerradas conteniendo un vaso con agua para mantener la humedad del medio.

2.2.6 Degradación de polipectato: Se utilizó el medio de cultivo Cristal Violeta Polipectato (CVP) según Cuppels y Kelman (1974). Este contiene por litro: nitrato de sodio 2g; citrato trisódico anhidro 5g; Triptona 1g; agar 5,6g; solución acuosa al 0,075% de Cristal Violeta, 2 ml; solución acuosa fresca al 10% de cloruro de calcio 13,6 ml y poligalacturonato de sodio (Sigma), 18 g. La actividad pectinasa se detectó en este medio de cultivo por la depresión producida en el agar en los alrededores y bajo las colonias de bacterias, Fig. 2.

2.2.7 Producción de acetoina, indol, acidez por debajo de pH 4,5 y H₂S: Se siguieron las técnicas habituales de microbiología para estas mediciones, según se recomienda en Blazevic y Ederer, 1975.

2.2.8 Disponibilidad de oxígeno: Para los crecimientos en anaerobiosis se incubaron los tubos con cultivos líquidos o las placas con medio sólido en Cámara Gas-Pak (BBL Microbiology Systems Decton Dickinson & Co.) con sobres productores de ambiente anaeróbico, de la misma procedencia.

2.2.9 Crecimiento en alta osmolaridad: Para estudiar el efecto de la osmolaridad en la expresión de proteínas de la membrana externa de *Ecc*, se utilizaron las condiciones

de cultivo descritas por Puente y cols. (1991). Los medios de cultivo utilizados fueron el Caldo Nutritivo (NB) (Bacto Nutrient Broth, Difco) como medio de mediana osmolaridad; y NB + sacarosa 0,57 M como medio de alta osmolaridad.

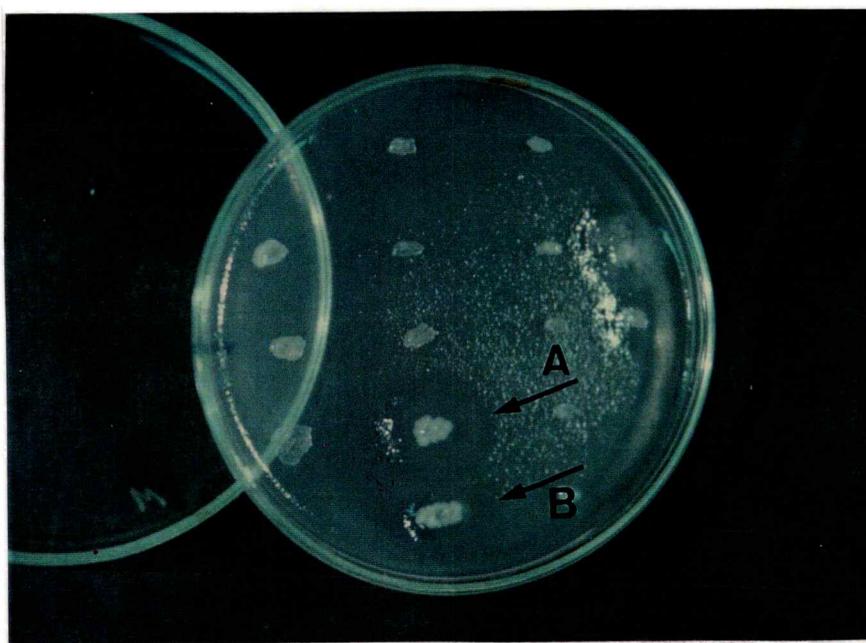


Figura 2. Halos de hidrólisis de polipectato producido por bacterias, en medio de cultivo Cristal violeta polipectato de sodio. Las flechas indican los halos y hundimiento del medio de cultivo, producido por (A) *Ecc 71* y (B) por *Ecc 193*.

También se observan colonias de bacterias no hidrolíticas.

2.3 Tubérculos de papa

2.3.1 Crecimiento de bacterias en medio conteniendo papas como sustrato: Para estudiar el efecto del organismo hospedero en el medio de cultivo, en la expresión de proteínas de membrana externa de *E.c.c.*, se realizaron cultivos en Medio Mínimo A1 en los que reemplazó la glucosa por trocitos de tubérculos de papas. Este, el Medio - Papa (MP) fué preparado según Shevchik y cols. (1992) en el que se lavaron las papas con agua, luego de secas se empaparon en alcohol y se pasaron por la llama del mechero, a continuación se pelaron con un bisturí estéril y se cortaron en trozos de 2 x 2 x 1 cm, los que se mojaron en alcohol nuevamente, pasados por la llama del mechero y luego lavados en agua destilada esteril. Por último, como se observa en la figura 3 se depositaron en matraces Erlenmeyer conteniendo Medio A1 ya estéril.

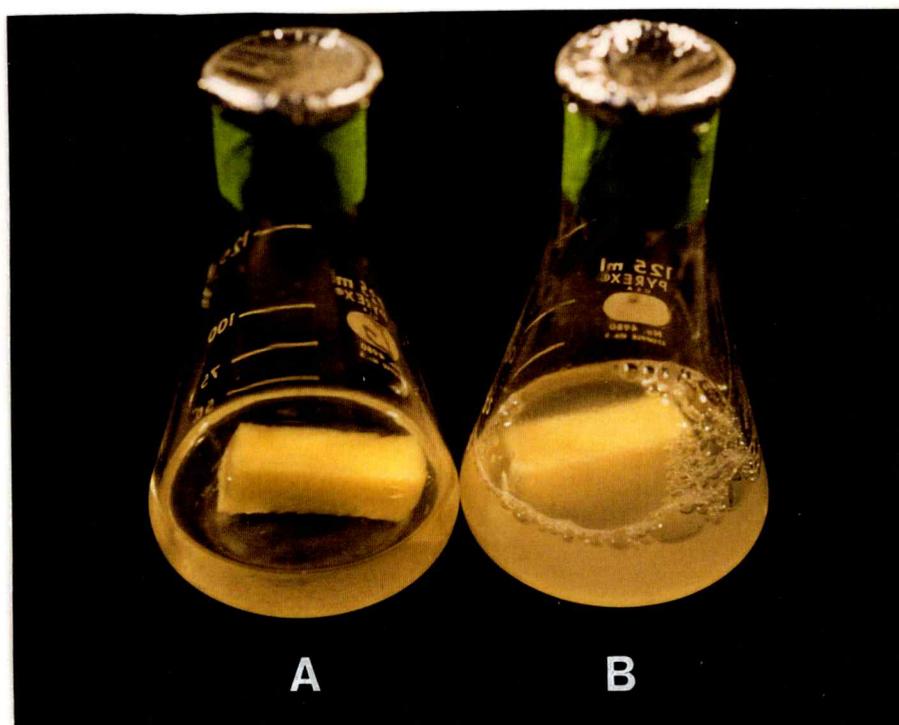


Figura 3.- Crecimiento de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, en medio de cultivo M-P. El medio contiene un trozo de tubérculo de papa como fuente de carbono, (A) control sin bacterias, (B) crecimiento de *Ecc* 71.

2.3.2 Ensayos de virulencia - maceración: Este ensayo fué realizado siguiendo básicamente el protocolo descrito por Murata y cols. (1990). Los tubérculos fueron adquiridos en un supermercado, lavados en agua corriente y luego sumergidos durante 10 min en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5 %. Después de esto, fueron lavados en agua corriente durante 20 min y secados al aire.

Los cultivos de *E.c.c.* crecidos durante la noche anterior a 28°C en Medio A1 , se ajustaron a una D.O.₆₀₀ igual a 0,3 utilizando el medio de cultivo respectivo. Luego se centrifugaron, y los sedimentos se resuspendieron en suero fisiológico en 1/5 del volumen original. A los tubérculos se les hicieron perforaciones de 2 cm de profundidad con mondadientes estériles, los que habían sido marcados para ese propósito. En dichas perforaciones se depositaron 5 ml de los cultivos concentrados, después de lo cual los orificios se sellaron con vaselina estéril. Después de incubar los tubérculos a 28°C por 48 hrs, en cámara húmeda cubierta por varias bolsas de polietileno, se cortaron en el mismo sentido de las inoculaciones y el tejido macerado se retiró con una espátula y guardó en tubos Eppendorf. Se determinó el porcentaje de actividad macerante, pesando el tejido macerado y tomando como 100% aquel producido por la cepa nativa, *Ecc 71*

2.4. Microscopía

Se inocularon papas con *Ecc 71* y con medio A1 estéril como se describió en la sección 2.3.2. Después de 48 horas de incubación en cámara húmeda, se cortaron trozos en forma de cubo conteniendo las zonas de inoculación, y se sumergieron en la mezcla de fijación F.A.A. (formalina 5% , ácido acético 5% y etanol de 70° al 90%) por 48 horas. Después se removieron de la mezcla y se cortaron

en dos partes, justo por la mitad de la perforación; una de las partes se destinó a microscopía óptica y la otra a microscopía electrónica.

2.4.1 Microscopía óptica: Se siguieron las técnicas estándar para embeber el material de estudio en Paraplast, cortado con micrótomo y luego ser teñido con Safranina y Fast Green, para el análisis histológico.

2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB): Las muestras fueron deshidratadas mediante el traspaso a través de una serie de soluciones con concentraciones crecientes de acetona, y las muestras en 100% de acetona fueron secadas en ambiente de CO₂ en un aparato Polaron E 3,000 de punto crítico de secado. Finalmente fueron recubiertas con una película de oro de 100 Å de grosor. La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-25-SII, del Laboratorio de Histología de la Fac. de CC.BB. de la P.U.C.

2.5. Proteínas

2.5.1 Preparación de membrana externa: Para la obtención de la fracción de membrana externa de las bacterias, se utilizó el método de Lobos y Mora (1991). La cepa crecida se sedimentó por 5 min a 5.000 rpm en Microfuga, se resuspendió en 500 µl de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y se sometió a ultrasonidos en hielo por 2 veces durante 60 seg (Equipo Vibra Cell de Sonics & Materials Inc. Danbury, Connecticut, USA.). La preparación se centrifugó nuevamente por 5 min a 5.000 rpm para sedimentar las bacterias que no hubiesen sufrido ruptura y luego el sobrenadante obtenido se centrifugó durante 45 min en microfuga, a 13.000 rpm para obtener la fracción de membranas. Este sedimento se suspendió en 500 µl de amortiguador Tris-

HCl 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, Tritón X-100 2% , se agitó vigorosamente en Vortex y se incubó a 37°C durante 30 min. Se volvió a centrifugar por 45 min a 13.000 rpm en microfuga y el sedimento resultante se resuspendió en 50 µl de amortiguador Tris- HCl 100 mM pH 8.0, SDS 2% y se guardó a -20°C.

2.5.2 Determinación de proteínas: La concentración de proteínas de las preparaciones de membrana externa bacteriana se determinó mediante el método de Markwell y col. (1978). En este se utilizaron los reactivos :

(A): Na₂CO₃ 2% ; NaOH 0,4% ; tartrato de sodio 0,16%; SDS 1,0%

(B): CuSO₄ x 5H₂O 4,0 %

Reactivo Folin Ciocalteu, diluido 1:1 con agua destilada.

Se agregaron 3 ml de reactivo (C) (100 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B) a las muestras preparadas en un volumen final de 1 ml. Después de incubarlas a temperatura ambiente por 30 min, se les agregó 0,3 mL de reactivo de Folin Ciocalteu. Las muestras se incubaron por 45 min en las mismas condiciones anteriores. La absorbancia de las muestras se midió a 660 nm usando como blanco una muestra preparada con agua destilada. La concentración de proteínas se calculó a partir de una curva estándar confeccionada con concentraciones entre 10 y 100 µg / ml de BSA.

2.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: La electroforesis de proteínas se realizó básicamente según la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando geles resolutivos y concentradores al 12,5% y 5% de acrilamida respectivamente, en sistema de minicámara. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Acrilamida : 30 % acrilamida ~ 0,8 % bisacrilamida

Solución (A) : Tris - HCl 1,5 M pH 8,8 ; SDS 0,4 %

Solución (B) : Tris - HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,4 %

Solución de corrida : Tris.Base 0,025 M; glicina 0,192 M, pH 8,4; SDS 1%.

Solución de carga (2x) : Tris - HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 6 %; glicerol 20 %;

2 - mercaptoetanol 0,05 % ; azul de bromofenol 0,002 %.

Solución de fijación : TCA 0,1 % ; isopropanol 50 %.

Solución de tinción : Azul de Coomassie R-250 0,2 %; TCA 0,1%;

isopropanol 25%

SDS : 10 %.

APS : 10 %

NaCl : 5 M .

Los minigeles se prepararon según el siguiente esquema:

Soluciones	Gel concentrador 5%	Gel separador 12,5%
Acrilamida- Bisacrilamida (ml)	0,35	3,00
Solución (A) (ml)	----	1,7
Solución (B) (ml)	0,50	----
SDS 10% (μ l)	17	70
TEMED (μ l)	3,75	10
H ₂ O dd. (ml)	0,90	1,40
NaCl 5M (μ l)	----	66,7
APS 10% (ml)	0,075	0,20

Las muestras se prepararon agregándoles la mitad del volumen de solución de carga Tris- HCl 125 mM, glicerol 20%, SDS 4%, β -mercaptoetanol 0.05%, Azul de Bromofenol 0.002%, y se calentaron a 100 °C por 5 min cuando fué necesario. Según la determinación de la concentración de proteínas de las muestras, se cargaron los microlitros necesarios para que cada carril contuviera alrededor de 20 μ g de proteína.

La electroforesis se efectuó a 60 Volts mientras las muestras atravezaban el gel concentrador, y a 200 V mientras lo hacían por el gel resolutivo. La corrida fué detenida según la posición que tuviera el estandar preteñido usado como referencia. El gel fué incubado en la solución de fijación por 30 min, después de lo cual fué dejado durante la noche en solución de teñido, al día siguiente fué desteñido en ácido acético al 10%.

En las ocasiones en que se realizó densitometría de las bandas de proteínas, se utilizó el programa de computación NIH/Image 160.

2.5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida-urea: Se prepararon geles de poliacrilamida - urea según la técnica descrita por Pugsley y Schnaitman (1978). Las soluciones utilizadas fueron las mismas que para los geles de poliacrilamida-SDS y la preparación siguió el mismo esquema señalado antes salvo que el gel resolutivo llevó urea a una concentración final 8 M, sin agregar NaCl 5 M.

2.5.5. "Immunoblot": Se realizó según la técnica descrita por Towbin y cols. (1979). Se transfirieron las bandas de proteínas, desde un gel de poliacrilamida-SDS no teñido, a papel de nitrocelulosa, poniendo a ambos en contacto y luego entre dos láminas de papel Whatman 3MM. Este conjunto se ubicó entre dos esponjas y luego

entre dos soportes de plástico perforado, el que se colocó en la cámara de transferencia, en posición tal, que el papel de nitrocelulosa quedó enfrentando al ánodo. El traspaso se hizo a temperatura ambiente a 200 mA durante 30 min, en una solución amortiguadora conteniendo Tris- HCl 25 mM; glicina 192 mM y metanol 20%; pH 8,4 . Con el objeto de bloquear los sitios de unión libres, el papel de nitrocelulosa se incubó en PBS conteniendo BSA al 1%, en agitación durante 30 min. Luego se agregó el antisuero específico, diluido 1 : 500 en PBS-BSA , el que se dejó actuar por 30 min en agitación, luego de lo cual se lavó por tres veces durante 10 min con una solución de PBS conteniendo Tween 20 al 0,5%. Después, se hizo la incubación del papel de nitrocelulosa con suero anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en PBS-BSA en las mismas condiciones anteriores. Luego se lavó 3 veces como se describió anteriormente y se dejó sumergido por 3 min en el amortiguador de sustrato (SB) (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM).

Para el revelado, se incubó en SB conteniendo el sustrato BCIP (5 Bromo-4-cloro-3- indolil fosfato) 0,16 mg/ml y NBT (azul de nitrotetrazolio) 0,33 mg/ml. La reacción se detuvo lavando con bastante agua destilada - EDTA 50mM.

2.6. Mutagénesis por recombinación homóloga.

Fragmentos cromosómicos que contienen Tn10, han sido transducidos (Perkins y cols., 1993; Liu y cols., 1993a; 1993b; Sanderson y Roth, 1988) desde *S. typhimurium* a otras cepas, mediante el fago P22, seleccionando los clones transductantes por su resistencia a tetraciclina.

Se realizaron los ensayos para transducir diferentes fragmentos cromosómicos con insertos Tn10, desde *S. typhimurium* a *Ecc 71*

utilizando el fago P22, con el fin de obtener mutantes con alguna alteración en las proteínas de membrana externa.

2.6.1 Producción de lisados: Preinóculos de cada una de las cepas de *S. typhimurium* que poseían inserto de Tn 10 en sus cromosomas en los sitios elegidos, se crecieron en Caldo Luria a 37°C durante la noche. A 1 ml de cada cultivo se le agregó 4 ml de Caldo P22, incubándose durante la noche a la misma temperatura. Al día siguiente, cada cultivo se centrifugó a 3000 xg durante 10 min y los sobrenadantes obtenidos se pasaron a través de filtros estériles de 0,2 mm y se almacenaron a 4°C.

2.6.2 Titulación de los lisados: Se creció *S. typhimurium* MS1 en CL durante la noche a 37°C, y al día siguiente se agregaron 200 µl de este cultivo a tubos conteniendo 2,5 ml de Agar blando fundido y mantenido a 45°C, después de lo cual se les agregaron diluciones de los lisados, en duplicados. Cada mezcla fué vertida sobre una placa de AL e incubada por 24 hrs a 37°C, se contaron las placas de lisis y se calculó el título de fagos de cada lisado.

2.6.3 Transducción de marcadores genéticos desde *S. typhimurium* a *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71: Se creció la cepa receptora Ecc 71 en medio salino A1 por 24 hrs a 28°C, se centrifugó a 3000 xg durante 10 min y se resuspendió en el mismo medio fresco al volumen inicial. Los lisados de fago P22 se usaron en la concentración obtenida o en dilución de 1/10. Se realizaron dos tipos de ensayos:

a) en medio líquido, mezclando volúmenes iguales de lisado de fago P22 y bacterias, incubando durante 60 min a 28°C sin agitación y plaqueando en medio CVP que contenía tetraciclina en concentraciones de 3, 4, 5, y 10 µg / ml;

b) en medio sólido, sembrando un césped de bacterias receptoras sobre placas CVP que contenían las concentraciones de tetraciclina señaladas anteriormente, y sobre el cual se depositaron 15 gotas, en forma individual, de 5 μ l c/u, de cada uno de los lisados. En ambos casos, las placas se incubaron a 28°C y se observaron diariamente, por un período de hasta 5 días, para el aislamiento de clones resistentes a tetraciclina.

2.7 Transformación

Se emplearon dos métodos: tratamiento de bacterias con CaCl_2 y electroporación.

2.7.1 Preparación de células competentes por el método de CaCl_2 : Las bacterias se sembraron en 1 ml de CL y se dejaron crecer durante la noche, al día siguiente este cultivo se inoculó en 100 ml de CL conteniendo MgCl_2 10 mM, que fueron incubados a 28°C por 4 - 5 horas hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 0,4. Se dejó en hielo por 20 min y luego se centrifugó a 1.500 x g por 5 min y a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en 1/3 del volumen inicial con amortiguador SB y se dejó nuevamente en hielo por 20 min. Se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores y luego las células fueron resuspendidas en 6,88 ml de SB y dejadas en hielo 60 min para lograr células competentes. Las células se usaron inmediatamente o bien se les agregó 1,12 ml de glicerol estéril, se alicuotaron en volúmenes de 200 μ l en tubos Eppendorf y se les dejó a 4°C por 30 min para luego guardarlas a -20°C, hasta el momento de ser ocupadas.

2.7.2 Transformación de células competentes: Se mezcló el contenido de un tubo Eppendorf de células competentes (200 μ l) con el DNA en una concentración de

10-50 ng contenido en un volumen máximo de 10 μ l. La mezcla se incubó 90 min en hielo y luego se le dió un pulso de calor (42°C por 90 seg) y se pasó rápidamente a hielo por 1 a 2 min. Luego se le agregó 400 μ l de CL y se dejó incubando 60 min a 28°C. Posteriormente se sembraron alícuotas de 100 μ l en placas de AL conteniendo el antibiótico apropiado.

2.7.3 Preparación de células electrocompetentes: El método utilizado para la preparación de células competentes para electroporación, fué básicamente el descrito por Chassy y cols., (1988). A partir de un preinóculo en Medio A1 incubado durante la noche, se sembró un inóculo de 100 μ l del mismo medio, incubándolo a 28°C hasta alcanzar una D.O₆₀₀ = 1.0. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1500 xg por 10 min y el sedimento se resuspendió en 1 volumen de agua desionizada, repitiéndose este paso tres veces. El último sedimento se resuspendió en agua desionizada en 1/5 del volumen original. Luego se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores y el sedimento se resuspendió en 1/500 de volumen de glicerol frío al 10%. Se guardaron alícuotas de 40 μ l a -20°C.

2.7.4 Transformación por electroporación: Esta se llevó a cabo según el método descrito por Chassy y cols. (1988), con algunas modificaciones. A un tubo de microfuga conteniendo 40 μ l de células electrocompetentes se le agregó 1 μ l de DNA (alrededor de 100 ng) y se mezcló cuidadosamente, dejándolo en hielo durante 5 min. Luego la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación cuidando en no introducir burbujas y se mantuvo en hielo hasta el momento de la electroporación. Una vez ubicada la cubeta en la cámara de electroporación, se fijó la resistencia a 200

ohms y la capacitancia a 25 mF dándose un pulso de 2,5 kilovolts. Luego se agregó a la cubeta 1 ml de CL + sacarosa 300 mM y se transfirió todo el contenido a un tubo de microfuga el que se dejó en agitación suave a 28°C durante 35 min, después de lo cual se centrifugó en microfuga y el sobrenadante (950 µl) se eliminó, resuspendiéndose el sedimento en los 50 µl restantes. Este volumen fué sembrado en placa de AA1 conteniendo el antibiótico apropiado para la selección de transformantes.

2.8 DNA.

2.8.1 Preparación de DNA genómico bacteriano: Se siguió la técnica descrita por Ausubel y cols. (1987) en que los restos celulares, polisacáridos y restos de proteínas son removidos por precipitación con CTAB, y el DNA de alto peso molecular se recupera por precipitación con isopropanol.

El cultivo crecido a saturación durante la noche, se centrifugó en microfuga por 2 min a 5.000 rpm, el sedimento se resuspendió en 565 µl de TE , y luego se le agregó 30 µl de SDS al 10% y 5 µl de proteinasa K 20 mg/ml. Esta mezcla se incubó por 1 hr a 37°C. A continuación se agregaron 120 µl de NaCl 5M y se mezcló en Vortex vigorosamente, después de lo cual se agregaron 80 µl de una solución CTAB 10% - NaCl 0,7 M. La extracción de DNA se realizó con un volumen igual de CF - IAA , se mezcló y luego centrifugó por 5 min en microfuga a 5.000 rpm. La fase superior acuosa resultante se trató con un volumen igual de fenol - CF - IAA, se mezcló y luego centrifugó igual al paso anterior. La fase superior se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol durante 15 min a temperatura ambiente, después de lo cual se centrifugó en microfuga. El sedimento se lavó con etanol al 70 % y

nuevamente se centrifugó en las condiciones anteriores; eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el DNA en 100 µl de TE.

2.8.2 Obtención de DNA plasmidial: Para el aislamiento de plásmidos, se utilizó la técnica descrita por Maloy (1990), creciendo las cepas durante la noche en CL y a 28°C o 37°C, dependiendo del tipo de bacteria. Las bacterias se centrifugaron durante 1 min en microfuga y el sedimento se resuspendió en 200 µl de solución de lisis, la que contenía glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente se le agregaron 400 µl de una solución SDS 10% - NaOH 10 N mezclando el contenido de los tubos por inversiones repetidas y dejando en hielo por 15 min. Luego se agregaron 300 µl de una solución de acetato de amonio 7,5 M y se procedió a mezclar suavemente por breves segundos después de lo cual se dejó en hielo por otros 10 min. Se centrifugó por 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante separado en un tubo limpio se sometió a una extracción con 250 µl de una mezcla de fenol: CF : IAA (24 : 23 : 1), agitado en Vortex y centrifugado en microfuga por 5 min. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo, a la que se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol manteniendo la mezcla por 10 min. a temperatura ambiente. Este se centrifugó por 30 min en microfuga y el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE . Se agregaron 2 µl de RNAsa 10 mg/ml preparada en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 4.8 y hervida por 10 min.

2.8.3 Purificación de DNA plasmidial: Para obtener una preparación de plásmidos purificados, se hizo una electroforesis en agarosa de tipo preparativa, después de lo cual la región del gel que contenía la banda de DNA plasmidial se cortó con un bisturí

esterilizado y se colocó en una bolsa de diálisis de 0,25 pulgadas de diámetro conteniendo TE. La bolsa de diálisis se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y el DNA se electroeluyó en 300 ml de TEA, durante 30 min a 70 mA y a temperatura ambiente. Luego se procedió a invertir la polaridad de la cámara por 30 seg y a recuperar el contenido de la bolsa, el cual fue centrifugado en microfuga por 10 min a 5.000 rpm, procedimiento que se repitió con el sobrenadante obtenido, para eliminar completamente posibles residuos de agarosa contaminantes. Se realizó la extracción del DNA electroeluido con la mezcla fenol: CF: IAA, luego se centrifugó en microfuga por 5 min a 10.000 rpm y la fase acuosa fue repartida en volúmenes de 400 µl en tubos limpios. Luego se realizó la precipitación del DNA con etanol según la técnica descrita anteriormente.

2.8.4 Electroforesis en geles de agarosa: La electroforesis del DNA cromosómico o plasmidial, se realizó utilizando geles de agarosa al 0,7 %, preparados en solución amortiguadora TEA, colocados en cámara horizontal e inmersos en TEA. Las muestras de DNA se prepararon en 1/3 v/v de solución de carga (glicerol 25%, SDS 0,5%, azul de bromofenol 0,025% y EDTA 12 mM), se calentaron durante 5 min a 65°C y luego fueron cargadas en los bolsillos del gel. La electroforesis se realizó a 70 mA durante 45 min aproximadamente. Las bandas de DNA fueron observadas en un transiluminador UV, previo tñido de los geles con una solución de bromuro de etidio 1 µg/ml durante 10 min. Los geles fueron fotografiados usando placas Polaroid Black and White Type 667.

2.8.5 Digestión del DNA con enzimas de restricción: Generalmente, se incubó 0,5 a 1,0 µg de DNA con 1-2 unidades de enzima de restricción en el amortiguador y

condiciones recomendadas por los proveedores. El tiempo de incubación fué de 2 hrs a 37°C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa entre 1-1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados.

2.8.6 Identificación de la inserción de Tn *IO* en el DNA cromosómico de las mutantes mediante PCR: Se utilizó la técnica de amplificación de un fragmento del gen de resistencia a tetraciclina *tetR* mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR). Para ello se diseñaron 2 iniciadores o "primers" basados en la secuencia de nucleótidos de la región *tetA* del gen de resistencia a tetraciclina *tetR* del transposón Tn *IO* (Nguyen y cols., 1983). Para el extremo N- terminal se sintetizó el OLITET 1 de 36mer: 5' CTG CAG CAT ATG AAT AGT TCG ACA AAG ATC GCA TTG 3'; y para el C-terminal, el OLITET 2 de 40mer: 5' CCGG CAT ATG AAG CTT GTG ACG AAA TAA CTA AGC ACT TGT 3', correspondiente a un fragmento que termina en el nucleótido 1293 del gen. Se utilizó DNA cromosómico de: *Ecc* 71, mutantes 311, 19, 20, 22, 4115 y de *S. typhimurium* 2947 como control positivo. Después de un comienzo a 92°C, se realizaron 35 ciclos de amplificación con un programa de desnaturalización a 92°C por 1 min, alineamiento de los iniciadores a 55°C por 1 min, y elongación a 72°C por 1 min; finalizando con una elongación de 7 min a 72°C, en un termociclador Programmable Thermal Controller, M.J. Research, Inc. Después de mantener los productos del PCR 4°C durante la noche, se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1,5 %.

2.8.7 Desestabilización de plásmidos: Para provocar la pérdida de plásmidos ("curación"), se cultivaron las bacterias por dos períodos sucesivos de 24 hrs cada, en el medio de cultivo de bajo contenido en fosfatos descrito por Torriani (1960). Éste,

denominado Medio Basal A-P contiene Tris Base 0,1 M; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,1 g; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g; citrato de sodio 0,5 g; el cual es ajustado a pH 7,4 con HCl y esterilizado en autoclave. Una vez frío, se le agrega glucosa a una concentración final del 0,1 % y K_2HPO_4 0,05 mM final.

2.8.9 Verificación de la estabilidad de plásmidos en *Ecc*. Las bacterias en estudio, se crecieron durante la noche en el medio de cultivo apropiado suplementado con el antibiótico de selección, se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial en Medio Mínimo A1 sin glucosa. Luego se prepararon diluciones también en Medio A1, para el desarrollo de viables, el que se realizó en CVP suplementado con el antibiótico en concentración apropiada. Se prepararon 3 grupos de tubérculos de papas para evaluar la evolución de la enfermedad. Los tubérculos fueron inoculados con las cepas, según se ha descrito en la sección Métodos 2.3.2., e incubados por grupos en cajas separadas. Los grupos de tubérculos se cosecharon en días sucesivos, es decir, a las 24, 48 y 72 hrs de incubación. La cosecha consistió en tomar los macerados producidos en cada inoculación, resuspenderlos en 1 ml de Medio A1 cada uno y después de homogenizados, fueron diluidos para la contabilidad de bacterias viables. Las diluciones se sembraron en placas de CVP con el antibiótico apropiado, y en un duplicado sin el antibiótico. El número de bacterias viables, en las placas con medio de cultivo suplementado con antibiótico tendría que ser igual al número de bacterias que se desarrollara en la placa correspondiente, de medio de cultivo sin antibiótico, para decidir que el plásmido era estable en una cepa bacteriana.

2.9 Determinación de la producción de exoenzimas por ensayo en placas.

En los ensayos para la determinación de secreción de enzimas al medio, se utilizaron placas Petri de 100 x 20 mm con 20 ml de medio de cultivo, suplementado con el sustrato adecuado. Cada placa fue dividida en tres sectores, en cada uno de los cuales fue sembrada una bacteria diferente. La siembra fue realizada depositando sobre la superficie del medio de cultivo 3 gotas, separadas unas de otras, de 5 µl c/u de bacterias crecidas hasta una D.O.₆₀₀ igual a 0,07. Se cuidó el nivel de la superficie tanto del mesón en que se montó este ensayo como del de las bandejas de la cámara de cultivo, para evitar la deformación de las gotas. Cumplido el tiempo de incubación, se midió el diámetro del halo de hidrólisis producido alrededor de las zonas de crecimiento microbiano.

2.9.1 Producción de pectinasas: Para determinar la secreción de pectinasas por las diferentes cepas bacterianas, se utilizó la técnica de He y cols., (1991) con algunas modificaciones. Se usó el Medio A1 suplementado con 0,4 % de poligalacturonato de sodio el que fue incubado durante la noche a 28°C. Las placas se inundaron con una solución de CTAB al 1,0% y luego se midieron los halos transparentes formados alrededor de cada mancha de crecimiento bacteriano.

2.9.2 Producción de proteasas: Se realizó la determinación del fenotipo secretor de proteasas en las bacterias, inundando con una solución saturada de sulfato de amonio, las placas de Agar gelatina que habían sido sembradas el día anterior con las bacterias en estudio. Se midió el halo de hidrólisis formado alrededor de cada mancha de crecimiento bacteriano. El Agar gelatina fue preparado con Triptona 1,0 g; gelatina 10,0 g; extracto de levadura 0,5 g; NaCl 0,5 g; agar 1,0 g; en 1 lt de agua dd.

2.9.3 Producción de celulasas: La determinación de celulasas secretadas por las bacterias, se realizó según el método descrito por Teather and Wood (1982), en placas de AL (agar 0,8 %) suplementadas con 0,1 % de carboximetilcelulosa (CMC). Después de la incubación de bacterias, se inundaron las placas con una solución de Rojo Congo 0,1% durante 15 min. Luego de eliminar la solución anterior, se inundaron con NaCl 1 M y se dejaron en reposo durante otros 15 min. Por último, se reemplazó esta solución por una de HCl 1N, después de lo cual el agar de la placa tomó un color azul y fué posible medir los halos de hidrólisis transparentes.

2.10 Determinación de sensibilidad a antibióticos (Cálculo del MIC). Los antibióticos se diluyeron en forma seriada a la mitad, en una serie de tubos conteniendo 1 ml de CL cada uno. Estos tubos se sembraron con una gota de cultivo bacteriano crecido durante la noche, a 28°C y se incubaron por 24 hrs a la misma temperatura. Se designó como concentración inhibitoria mínima (MIC), a la menor concentración de antibiótico en que no se encontró desarrollo bacteriano.

2.11 Aislamiento de mutantes *tet^s*. Para detectar clones que han perdido la resistencia a tetraciclina, se utilizó el ensayo de Maloy y Nunn, 1981. Este está basado en la utilización del medio de cultivo Bochner-Maloy, el cual está formado por:

A : agar 15 g; Triptona 5 g y extracto de levadura 5 g; clortetraciclina 50 mg, en 500 ml de agua desionizada. B : NaCl 10 g; NaH₂PO₄ . H₂O 10 g en 500 ml de agua desionizada. Estos medios de cultivo se autoclavan por separado, y una vez enfriados a 50°C se mezclan y se les agrega 5 ml de una solución de ZnCl₂ 20 mM, con 15 mg de ácido fusárico, la que ha sido esterilizada previamente, mediante filtración. Luego, la mezcla completa es vertida en placas Petri.

RESULTADOS

1.- Caracterización de *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* 71 .

1.1. Características metabólicas.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* 71 (*Ecc* 71) es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, y como tal posee muchas características metabólicas y de crecimiento comunes con otros géneros de esta familia. Para tener un patrón de comparación con otras bacterias relacionadas que se ocuparían en este trabajo, se estudiaron las propiedades metabólicas y de crecimiento como se señala en la sección 2.1 de Materiales y Métodos, con las técnicas rutinarias para la identificación de cepas usadas en un laboratorio de Microbiología y se compararon con las tablas diseñadas para tal propósito en Brenner (1984) del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", y en Starr (1981b) del texto "The Prokaryotes". En la Tabla 3 se muestran en su mayor parte los resultados de pruebas que marcan alguna diferencia entre las cepas de *Ecc* 71, *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1.

1.2 Observación microscópica de la invasión de tejidos de tubérculo de papa por *Ecc* 71.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* es un fitopatógeno capaz de producir la maceración enzimática del tejido parenquimatoso del tubérculo de papa. Una de las vías de entrada de esta bacteria al tubérculo, es por las lenticelas de la peridermis, ya que los espacios intercelulares de éstas se continúan con aquéllos de

Tabla 3.

Características bioquímicas, fisiológicas y de cultivo de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71, *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1.

	<i>E.c.c.</i> 71	<i>E. coli</i> K12	<i>S.t.</i> MS1
H ₂ S de Cisteína	+	~	+
Degradación de pectato	+	~	~
Producción de acetoína	+	~	~
Reacción de Rojo de Metilo	~	+	+
Producción de Indol	~	+	~
Hidrólisis de Gelatina	+	~	~
Producción de ácido desde:			
Lactosa	+	+	~
Maltosa	~	+	+
Sacarosa	+	~	~
Alfametilglucósido	~	~	~
Sustratos como única fuente de carbono:			
Citrato	+	~	+
Glicerol	~	+	+
Celobiosa	+	ND	ND
Rafinosa	+	ND	ND
Inositol	+	ND	ND
Motilidad	+	~	+
Crecimiento en 5% NaCl	+	~	+
Temperatura óptima de crecimiento	27-30°C	37°C	37°C
Sensibilidad a 50ug de Eritromicina	~	~	~
Requiere de factores de crecimiento	~	~	~

los tejidos internos, lo que facilita la invasión por el patógeno. Otra vía de entrada muy común, son las heridas producidas en la superficie por equipos de labranza, labores de cosecha, lavados, almacenamiento, etc. las cuales dejan expuestos los tejidos susceptibles del tubérculo, los que son colonizados entonces por estas bacterias.

Para visualizar las bacterias dentro de su organismo hospedante, la distribución de ellas con respecto a los tejidos, y el daño producido; se infectaron papas como se indica en la Sección 2.3.2 de Materiales y Métodos, por punción de la superficie con un mondadientes e inoculación de una alicuota de cultivo de *Ecc* 71 en la perforación. Lo mismo se hizo con papas controles, inoculando en la perforación el mismo volumen pero del medio de cultivo A1 estéril. De cada lugar inoculado se hicieron preparaciones para la observación al Microscopio Óptico (MO) y para el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) como se encuentra detallado en la Sección 2.4 de Materiales y Métodos.

Las figuras 4, 5 y 6 corresponden a observaciones al microscopio óptico, de cortes de tubérculo de papa, teñidos con el Método de Safranina-Fast Green. La figura 4 representa un corte por tubérculo sano, en el que se pueden observar la zona externa de la peridermis (punta de flecha) y bajo ella una zona de células dispuestas en filas hacia el interior, el felema o corcho, luego se distingue el parénquima formado por células globosas sin espacios intercelulares, conteniendo gránulos de almidón.

La figura 5 muestra la desintegración del tejido parenquimatoso provocado por la acción enzimática de *Ecc* 71 sobre la lámina media, la que se produce por debajo de la peridermis. El color verde oscuro en los bordes celulares, indicado por flechas, muestra la acumulación de bacterias, detalle que se observa con mayor aumento en la figura 6, y que muestra cómo la bacteria va ubicándose en los

espacios intercelulares lugar, en que depolimeriza los componentes de las paredes celulares vegetales.

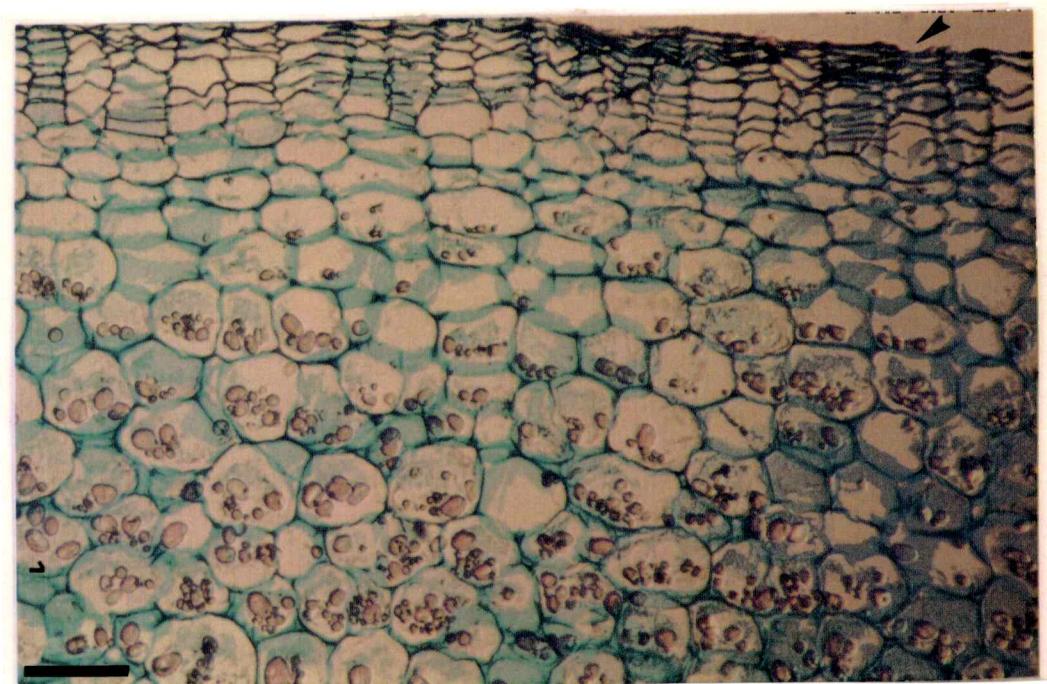


Figura 4. Corte por tubérculo de papa. Se observa la peridermis (punta de flecha), y las células del parénquima de reserva conteniendo amiloplastos. Microscopía óptica, tinción con método Safranina-Fast Green.

Barra de referencia = 100 μm

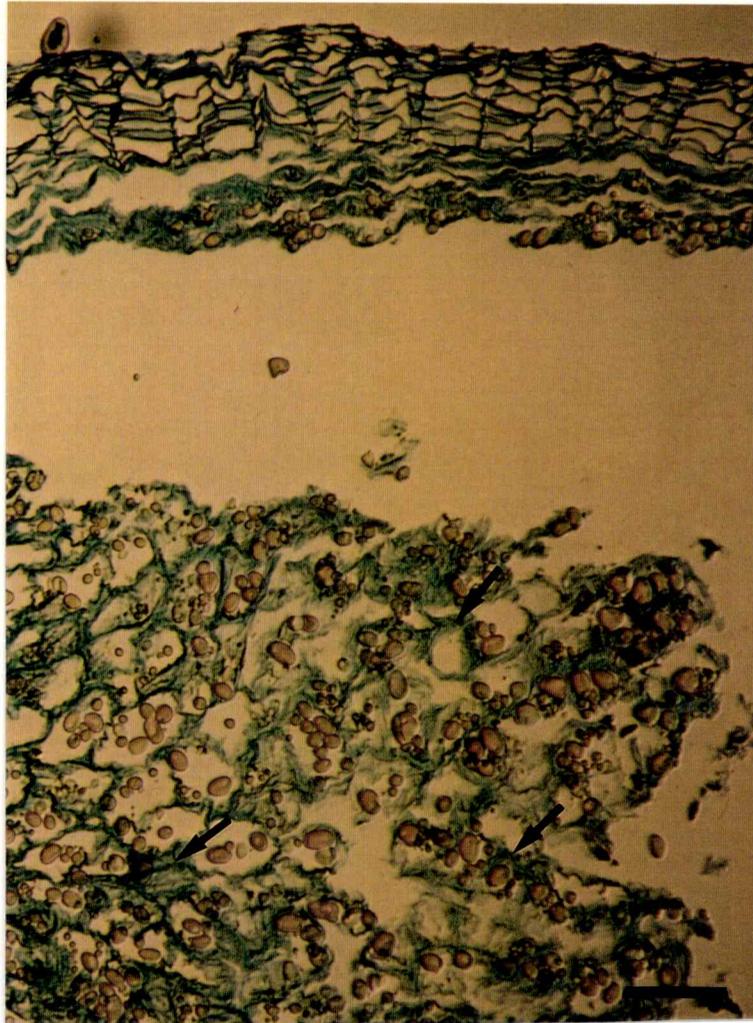


Figura. 5. Corte por la zona de maceración de un tubérculo de papa provocada por *Ecc* 71 después de 24 hrs de inoculación. Las flechas señalan zonas de acumulación de bacterias en los espacios intercelulares. Se observa una gran zona de destrucción celular, que separa las capas de la peridermis y el tejido interno en donde se encuentran las flechas. Microscopía óptica, tinción con el método Safranina-Fast Green.

Barra de referencia = 100 μm

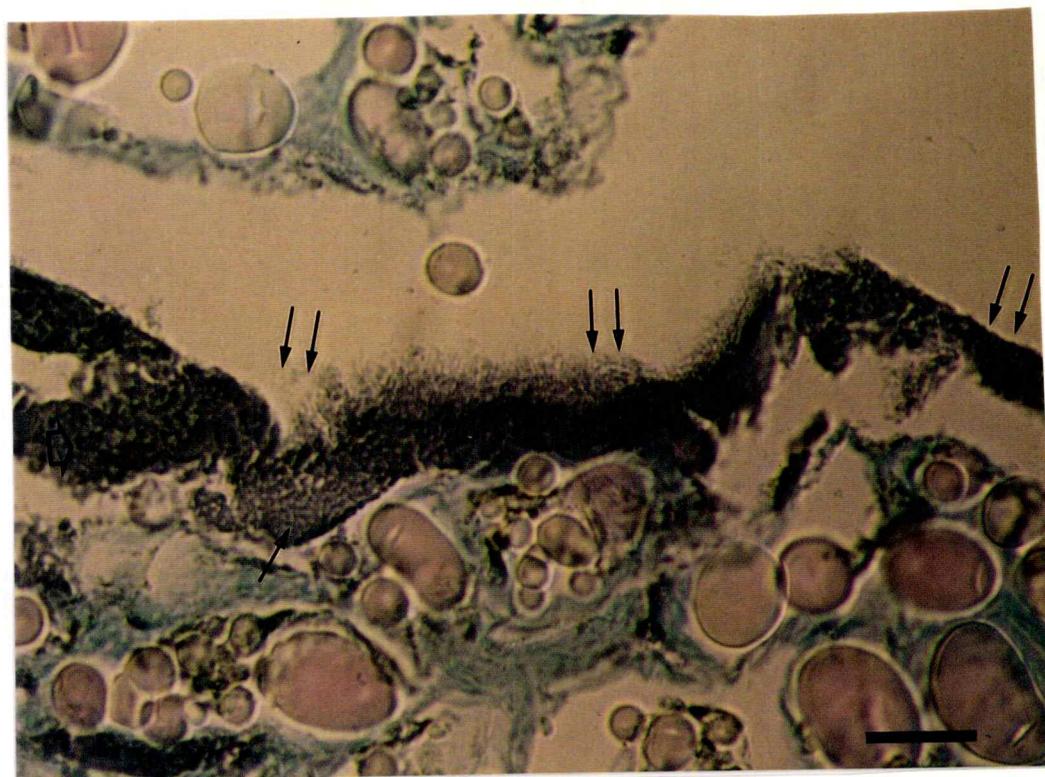


Figura 6. Corte por tubérculo de papa en la zona de maceración. Lesiones producidas por *Ecc* 71 después de 24 hrs de inoculación. Todas las flechas señalan las masas de bacterias acumuladas. Microscopía óptica, tinción con método Safranina-Fast Green. Barra de referencia= 25 μ m

Las figuras 7 y 8 corresponden a MEB de tubérculo de papa infectado por *Ecc* 71. Se puede observar en la figura 7 la morfología bacteriana, mientras en la figura 8 se observan los espacios producidos por la maceración del tejido vegetal y a las células separadas unas de otras. Las flechas están indicando los lugares en que las bacterias han logrado degradar la membrana celular, etapa que ocurre posterior a la depolimerización de pared celular. La figura 9 muestra una zona de la figura 8 con mayor aumento, en que se señalan las perforaciones producidas en la pared de las células vegetales.

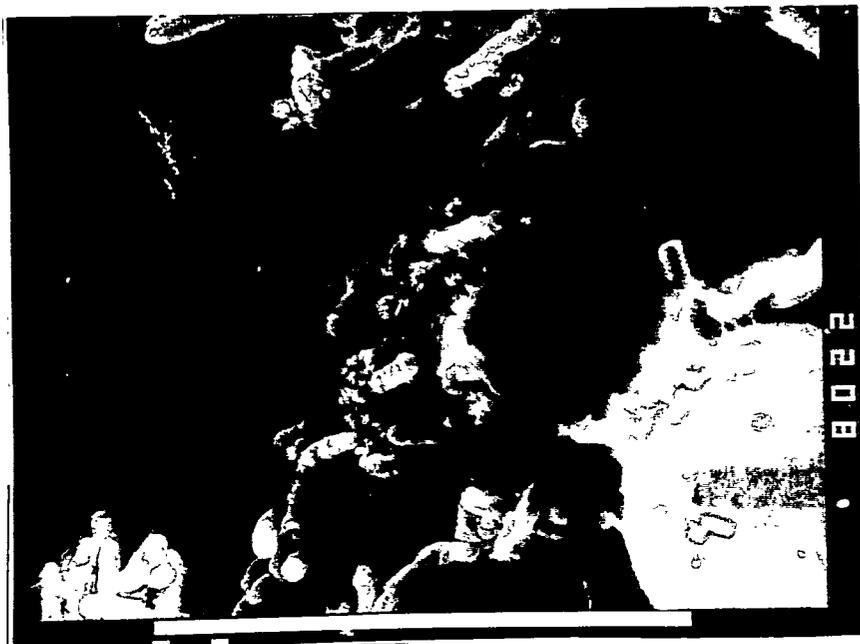


Figura 7. Morfología de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* al MEB. Corte por la zona de maceración de un tubérculo de papa, después de 24 hrs de su inoculación con *Ecc* 71. Barra blanca de referencia = 10 μm



Figura 8. Maceración en tubérculo de papa al MEB. Corte por la zona de inoculación de *Ecc* 71. Se observa la pérdida de continuidad del tejido parenquimatoso, ausencia de lámina media entre las células y la presencia de perforaciones en la superficie de algunas de ellas. La flecha indica la célula que fue escogida para ser mostrada con mayor aumento en la figura 9. Microscopía Electrónica de Barrido. Barra de referencia = 100 μm

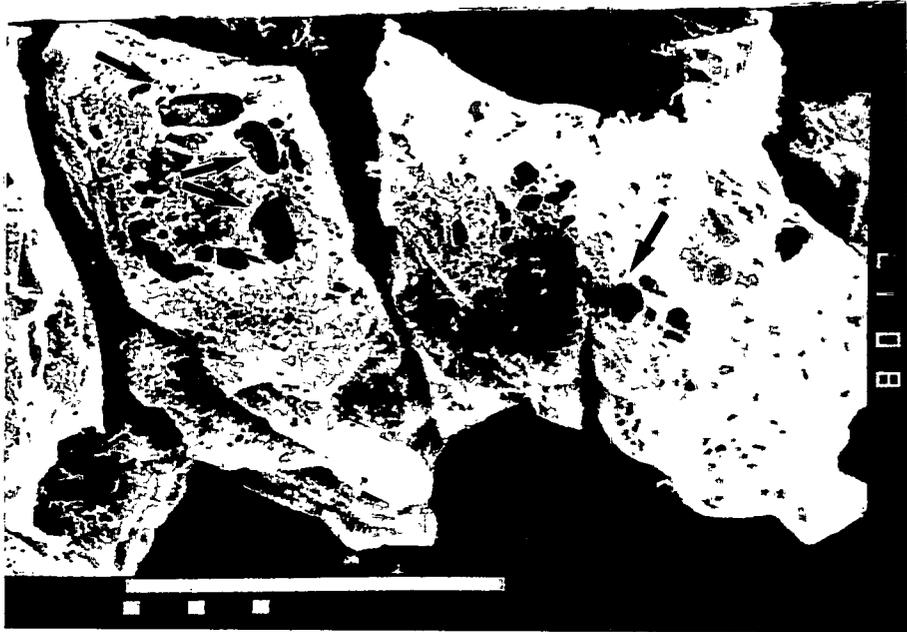


Figura 9. Lesiones de la pared de las células parenquimatosas de tubérculo de papa. Las flechas señalan algunas de las perforaciones producido por *Ecc* 71 en la superficie celular. Esta figura corresponde a un aumento del sector señalado con flecha blanca en la figura 8. Microscopía Electrónica de Barrido. Barra de referencia = 100 μm

1.3 Maceración del parénquima del tubérculo de papa.

Ecc produce la maceración del tejido vegetal, cuando es inoculada en perforaciones de la superficie de un tubérculo de papa, y en condiciones de humedad y anaerobiosis adecuadas. Este proceso es producido por la acción de numerosas enzimas pectinolíticas, celulolíticas y proteolíticas secretadas por estas bacterias. La figura 10 muestra el corte de un tubérculo inoculado en (A) con *Ecc* 71, en (B) con medio de cultivo A1 estéril; y en (C) con *Ecc* 193. Se puede observar el aspecto acuoso del tejido señalado por las flechas, que corresponde a la denominada "pudrición blanda", y que puede ser separado del resto de tejido sano mediante una espátula, obteniéndose una cavidad de límites muy definidos, bajo el peridermo de la zona de inoculación, el cual no es atacado, como se observa en la figura 11.

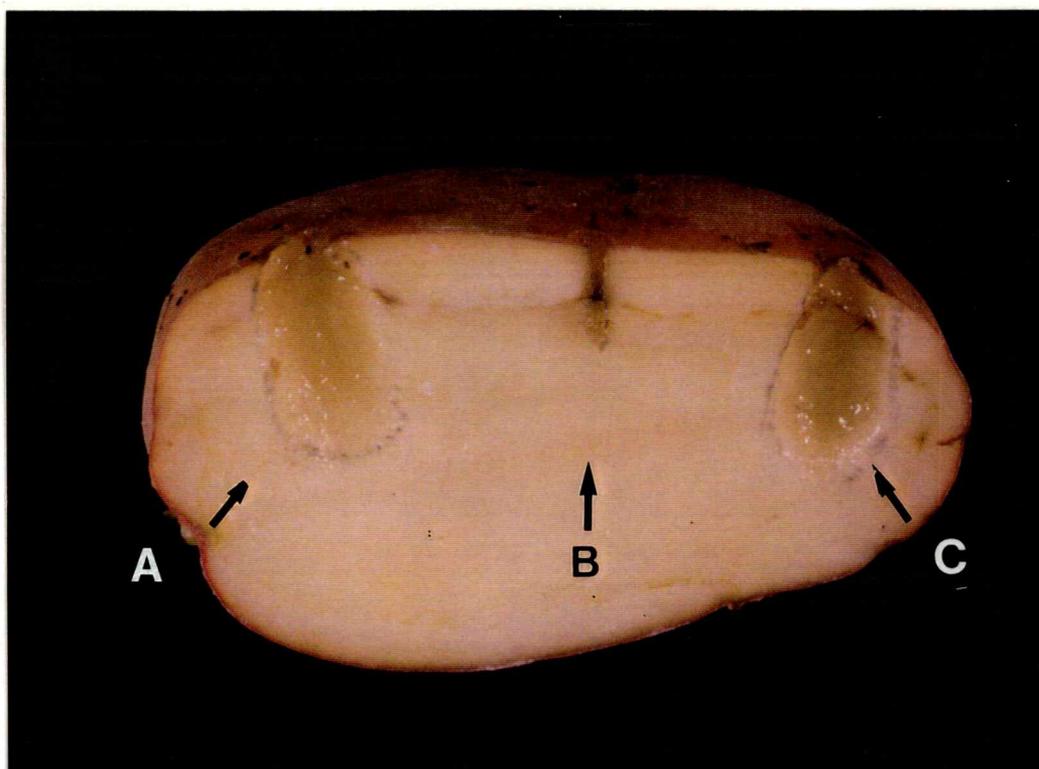


Figura 10. Efecto de la inoculación de *Ecc* en un tubérculo de papa. Corte por las zonas de maceración (flechas) producidas por dos cepas de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (A) cepa 71, (C) cepa 193; y (B) control con medio de cultivo A1.

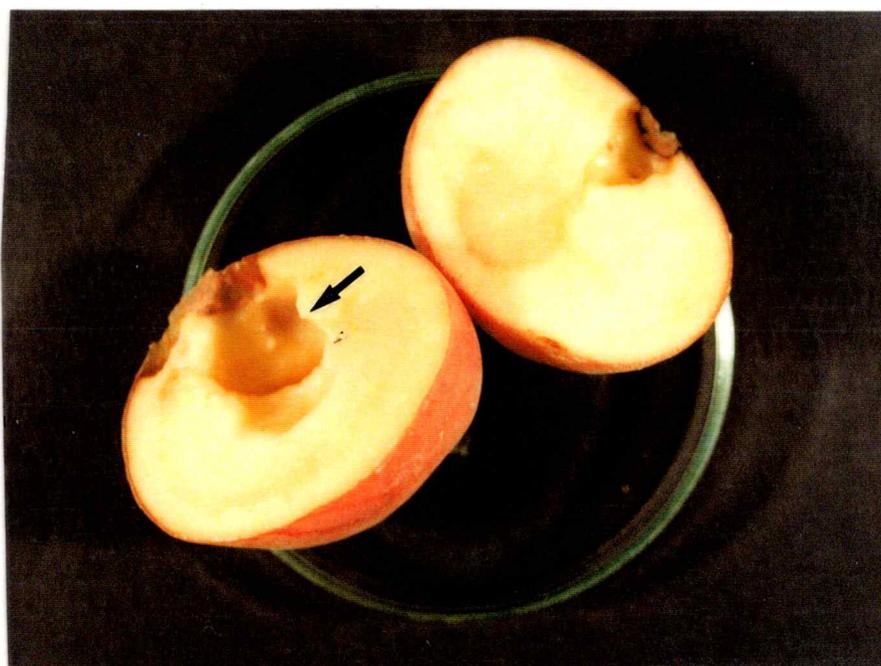


Figura 11. Vaciado de zona de maceración en tubérculo de papa. Corte por tubérculo de papa, mostrando la cavidad producida por la pudrición blanda, al ser eliminado el tejido macerado, mediante la ayuda de una espátula.

1.4 Perfil de proteínas de Membrana Externa de *Erwinia carotovora* subsp.

carotovora 71.

Para analizar el patrón de proteínas de membrana externa (OMP) de *Ecc*, se realizaron electroforesis de las preparaciones de membrana de esta bacteria tanto en sistema de geles de poliacrilamida-SDS, como de poliacrilamida-SDS-urea. Según se observa en la figura 12 A, (carril 2), correspondiente a PAGE-SDS, esta bacteria presenta un perfil de proteínas claramente diferente de aquéllos pertenecientes a *E. coli* y *S. typhimurium* (carriles 1 y 3 respectivamente) en cuanto al número y posición de las bandas proteicas presentes en mayor concentración dentro de los rangos de masas moleculares de 48,5 a 26,6 kDa . En la figura 12 A se indican las bandas de proteínas OmpC, OmpF, y OmpA identificables en *E. coli* y en *S.typhimurium*, además de OmpD correspondiente sólo a esta última especie.

Es un hecho conocido, que bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* poseen proteínas de membrana externa en forma de unidades triméricas, como lo son las porinas OmpC, OmpF y OmpD y que cuando son solubilizadas en SDS bajo condiciones suaves de temperatura, exhiben masas moleculares entre 100 a 200 kDa según la especie y por lo tanto, se encuentran ausentes en las localizaciones que habitualmente se obtienen en PAGE con muestras calentadas a 100°C/5 min. Por otra parte, la proteína OmpA, también muy conservada entre las representantes de estas bacterias cuando es solubilizada en forma suave en SDS, posee mayor movilidad electroforética que si la muestra de proteínas fuera calentada a 100°C/5 min. Esta es una proteína de membrana externa que corresponde a aquellas designadas en *Enterobacteriaceae* como proteínas modificables por calor.

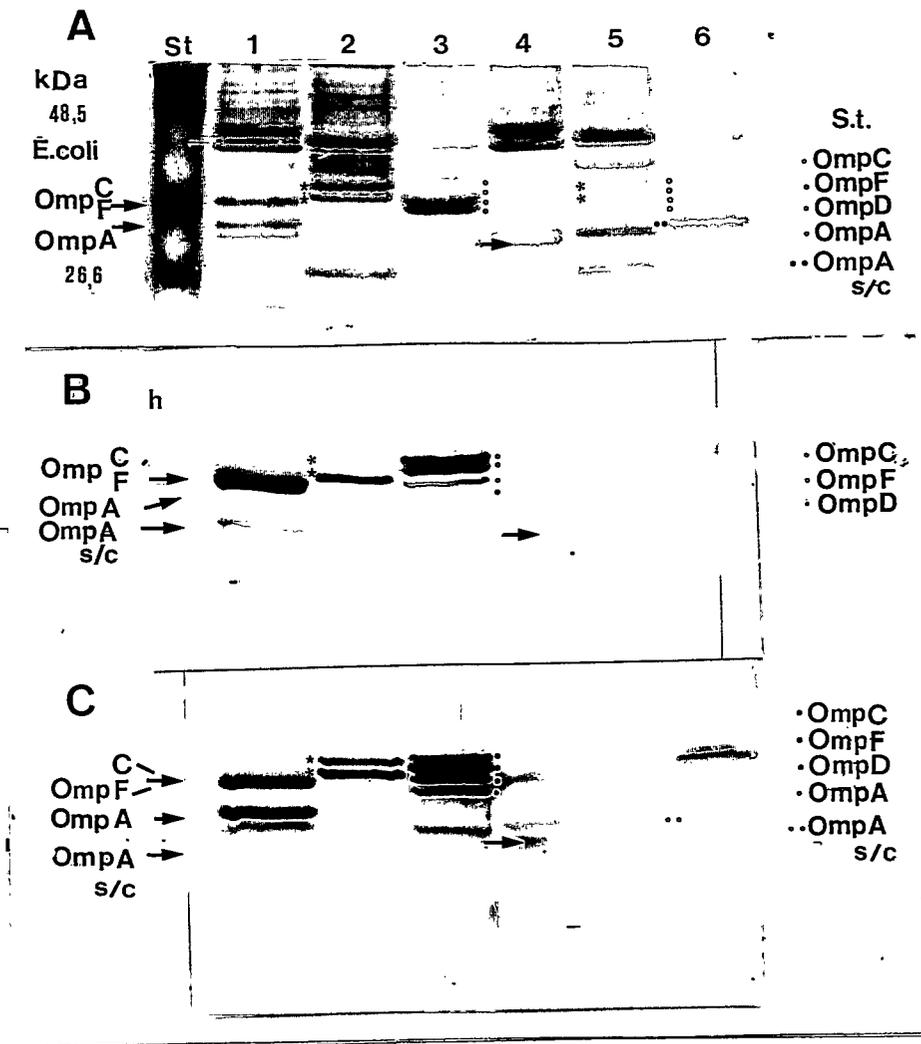


Figura 12. Electroforetograma de proteínas de ME de *E. coli* K12, *Ecc* 71 y *S. typhimurium* (A); e "immunoblots" con sueros anti- OmpC de *S. typhi* (B) y anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium* MS1 (C).

(A) Extractos de proteínas de ME separados en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5 % . Carriles: 1, 2 y 3 contienen las muestras calentadas a 100°C durante 5 min; carriles 4, 5 y 6 contienen las muestras sin calentar, lo que mantiene a las porinas como trímeros e impide que migren hasta la zona de 30-40 kDa; carriles 1 y 4, *E. coli* K12; carriles 2 y 5, *Ecc* 71; carriles 3 y 6, *S. typhimurium* MS1; carril St, contiene los marcadores de masas moleculares preteñidos: piruvato quinasa(58 kDa), fumarasa(48,5 kDa), láctico deshidrogenasa(36,5 kDa) y triosa- fosfatoisomerasa (26,6 kDa). Se muestra sólo la zona relevante del gel.

Símbolos: Flechas señalan OmpC, OmpF y OmpA de *E. coli* K12. Estrellas señalan OmpA y OmpE de *Ecc* 71. Círculos señalan OmpC, OmpF, OmpD y OmpA de *S. typhimurium* MS1.

(La leyenda de esta figura continúa en la página siguiente)

(cont. figura 12)

(B) Análisis por "immunoblot" con suero antiporina OmpC de *S. typhi* de las proteínas del electroforetograma mostrado en (A), los carriles contienen las muestras en las mismas condiciones señaladas en (A)

(C) Análisis por "immunoblot" con suero que contiene una mezcla de antiporinas OmpF/OmpA de *S. typhimurium*, de las proteínas del electroforetograma mostrado en (A), los carriles contienen las muestras en las mismas condiciones señaladas en (A).

Símbolos: Igual que en (A), además, s/c indica "sin calentar", la flecha OmpA s/c señala la banda de proteínas de *E. coli* en el carril 4, y el doble círculo OmpA s/c señala la banda de proteínas de *S. typhimurium* del carril 6.

Considerando estos hechos, y con el fin de identificar dichas proteínas en *Ecc* 71 y compararlas con aquellas de *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1 se hicieron migrar las proteínas de membrana externa de estas bacterias, en amortiguador de carga calentadas a 100°C (figura 12 A, carriles 1, 2 y 3) y sin calentar (figura 12 A, carriles 4, 5 y 6). Se observan las proteínas de *Ecc* 71 (carril 2), 2 de cuyas bandas proteicas , marcadas con estrellas, se encuentran ausentes en el carril 5; así también se pueden identificar las proteínas OmpF , OmpC y OmpA de *E. coli* , indicadas con flechas en el carril 1 y las proteínas OmpF, OmpC, OmpD y OmpA de *S. typhimurium* indicadas con círculos en el carril 3, todas al igual que en el caso anterior se encuentran ausentes en sus carriles respectivos (4 y 6), cuando las muestras no son calentadas. Esto está indicando que estas proteínas corresponden a aquellas que forman unidades multiméricas, las que al no ser disociadas, se mantendrán ocupando posiciones entre los 100 a 200 kDa en PAGE-SDS y no serán observables en los rangos de masas moleculares que se muestran en la figura 12 A. Por otra parte se puede observar en las tres muestras sin calentar, la presencia de una nueva banda en el rango de masa molecular de 30 kDa y que en los casos de *E. coli* y *S. typhimurium*, se sabe que corresponde a la proteína OmpA.

1.5 Identificación de dos proteínas de Membrana Externa de *Ecc* 71

Para verificar la existencia de proteínas relacionadas con porinas en *Ecc*, se realizaron 2 “immunoblots” a partir del PAGE-SDS mostrado en la figura 12 A de proteínas de membrana externa, uno de ellos utilizando anticuerpos contra la porina OmpC de *S.typhi* (figura 12 B), y el otro con un antisuero que contenía una mezcla de anticuerpos contra la porina OmpF y contra la proteína OmpA de *S. typhimurium* (figura 12 C). Se puede observar en la figura 12 B, que una sola banda de proteínas de *Ecc* 71 es reconocida por el antisuero OmpC (carril 2), la que presenta una masa molecular aparente mayor que OmpC de *E. coli* (carril 1) y menor que OmpC de *S. typhimurium* (carril 3), además se puede constatar que existe una reacción cruzada del antisuero OmpC con la porina OmpF en las bacterias controles. En cuanto al resultado con el antisuero OmpF/OmpA, se observa en la figura 12 C (carril 2) la presencia de dos bandas en *Ecc* 71, una que conserva la posición de aquella reconocida por antiOmpC y otra de mayor masa molecular aparente y que estaría reaccionando con los anticuerpos anti-OmpF/anti-OmpA.

Los carriles 4, 5 y 6 de la figura 12 B muestran la ausencia de bandas que reaccionen con el suero antiOmpC, si se las compara con las muestras calentadas (carriles 1,2 y 3 respectivamente), lo que está corroborando el hecho que estas proteínas corresponden a aquellas que al no ser solubilizadas completamente permanecen como trímeros y así ocupan posiciones superiores a 200 kDa, en el caso que ingresen al gel separador. En la figura 12 C se observa la presencia de bandas reaccionantes en *E. coli* (carril 4) y en *S. typhimurium* (carril 6), con distinta movilidad electroforética que en las muestras calentadas y correspondientes a OmpA; mientras en *Ecc* 71 (carril 5) se mantiene una banda de baja masa molecular que ya estaba aparentemente presente en la muestra calentada.

Para optimizar la separación electroforética de porinas en los geles, se realizó una electroforesis de las proteínas de ME, en geles de poliacrilamida SDS-Urea (figura 13 A) y el "immunoblot" con suero anti-OmpC de *S. typhi* (figura 13B). En la figura 13 A se observa, en el carril 1, dos bandas de proteínas indicadas con estrellas pertenecientes a *Ecc 71*; en el carril 2 se han marcado las proteínas OmpC, OmpF y OmpA de *E. coli*; y en el carril 3 se muestran las bandas OmpC, OmpF, OmpD y OmpA de *S. typhimurium*.

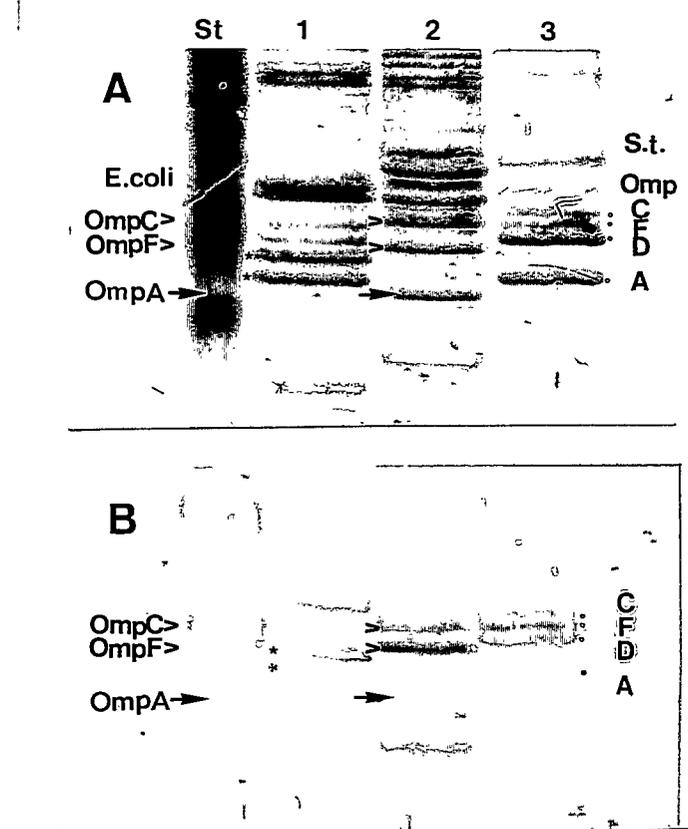


Figura 13. Perfil de proteínas de ME de *Ecc 71*, *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1 (A) e "immunoblot" contra suero antiporina OmpC de *S. typhi* (B). Los símbolos corresponden a los indicados en la figura 12

(A). Extractos de ME fueron separados en PAGE-SDS-Urea al 12,5 %; se muestra sólo la región de interés del gel. Carril St, patrones de masas moleculares; carril 1, *Ecc 71*; carril 2, *E. coli* K 12; carril 3, *S. typhimurium* MS1.

(B) "Immunoblot" del electroforetograma mostrado en (A) contra suero antiporina OmpC de *S. typhi*. Las muestras de los carriles corresponden a las de (A).

En la figura 13 B observan las bandas proteicas de las porinas de *E. coli* (carril 2), de *S. typhimurium* (carril 3) reconocidas por el suero anti-OmpC y además de una de las bandas de *Ecc 71* (carril 1). La posición de esta última banda correspondería entonces a aquella que presenta menos migración de las dos señaladas en la figura 13 A, por lo que, comparado con el resultado mostrado en la figura 12 B las dos bandas proteicas principales de ME en *Ecc 71* invertirían su movilidad electroforética dependiendo del sistema utilizado. La presencia de bandas reaccionantes adicionales en este "immunoblot", se estimó que correspondían a una sobre-reacción con el antisuero. Sin tener mayores antecedentes acerca de las propiedades de la proteína de *Ecc 71* reconocida por antiOmpC, y que podría corresponder a OmpC o a OmpF, se optó por denominarla temporalmente OmpE.

Para conocer las masas moleculares relativas (M_r) de las bandas de proteínas consideradas OmpE y OmpA de *Ecc 71*, se calcularon los R_{fs} de ellas, en base a geles semejantes a la figura 12 A, dando como resultado M_{rs} de alrededor de 37,9 y 40,0 kDa respectivamente. Como controles de referencia en el mismo gel, se usaron las proteínas de OM de *E. coli* y *S. typhimurium*. Según la literatura (Benz y Bauer, 1988), OmpC y OmpA de *E. coli* poseen M_r de 36.0 y 35.0 kDa respectivamente, mientras los de OmpC y OmpD de *S. typhimurium* corresponden a 39,8 y 38,0 kDa respectivamente, datos que coincidirían con las posiciones mostradas por dichas proteínas en este gel.

1.6 Regulación de la expresión de proteínas de membrana externa dependiendo de las condiciones ambientales.

En las bacterias Gram-negativas las respuestas adaptativas a los cambios del medio ambiente afectan la composición de fosfolípidos de membranas,

inducen cambios en las propiedades iónicas, en los constituyentes macromoleculares del citoplasma y espacio periplásmico, como también generan cambios en la composición de proteínas de la ME. Es así como el número de moléculas de OmpC y OmpF puede variar considerablemente por cambios en la temperatura, osmolaridad o composición del medio de cultivo (Forst e Inouye, 1988). Con el fin de conocer los efectos del medio sobre la expresión de OmpE y OmpA de *Ecc 71*, se cultivaron las bacterias en las condiciones señaladas más adelante y se estudiaron los perfiles de proteínas de ME.

1.6.1 Efecto de la osmolaridad.

Tanto *Ecc 71* como *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1 fueron crecidas a 28°C en NB (Difco) como medio de cultivo de baja osmolaridad {40 mosM} y en NB conteniendo 0,57M sacarosa (Puente y cols., 1991) como medio de cultivo de alta osmolaridad (540 mosM aprox.). Además se cultivó para la cepa *Ecc 71* tanto en el Medio A1, (medio de crecimiento rutinario para esta especie, en este trabajo), como en el Medio A1 conteniendo 5,0 % de NaCl. Una vez que los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,4$ fueron cosechados y los extractos de membrana externa analizados mediante PAGE-SDS, de los cuales se realizó la densitometría utilizando el programa de computación NIH/Image 160. En la figura 14 A se observan los perfiles de proteínas de cada cepa en las condiciones de crecimiento antes descritas y en la figura 14 B se muestra sólo las densitometrías de las proteínas de *Ecc 71*.

Como se observa en el perfil de proteínas en poliacrilamida-SDS de la figura 14 A, la cepa *Ecc 71* presenta una mayor expresión de la proteína OmpE en Medio A1 (carril 2), lo que sugiere un comportamiento funcional más del "tipo OmpF" para esta proteína, llega a ser comparativamente igual que OmpA en el

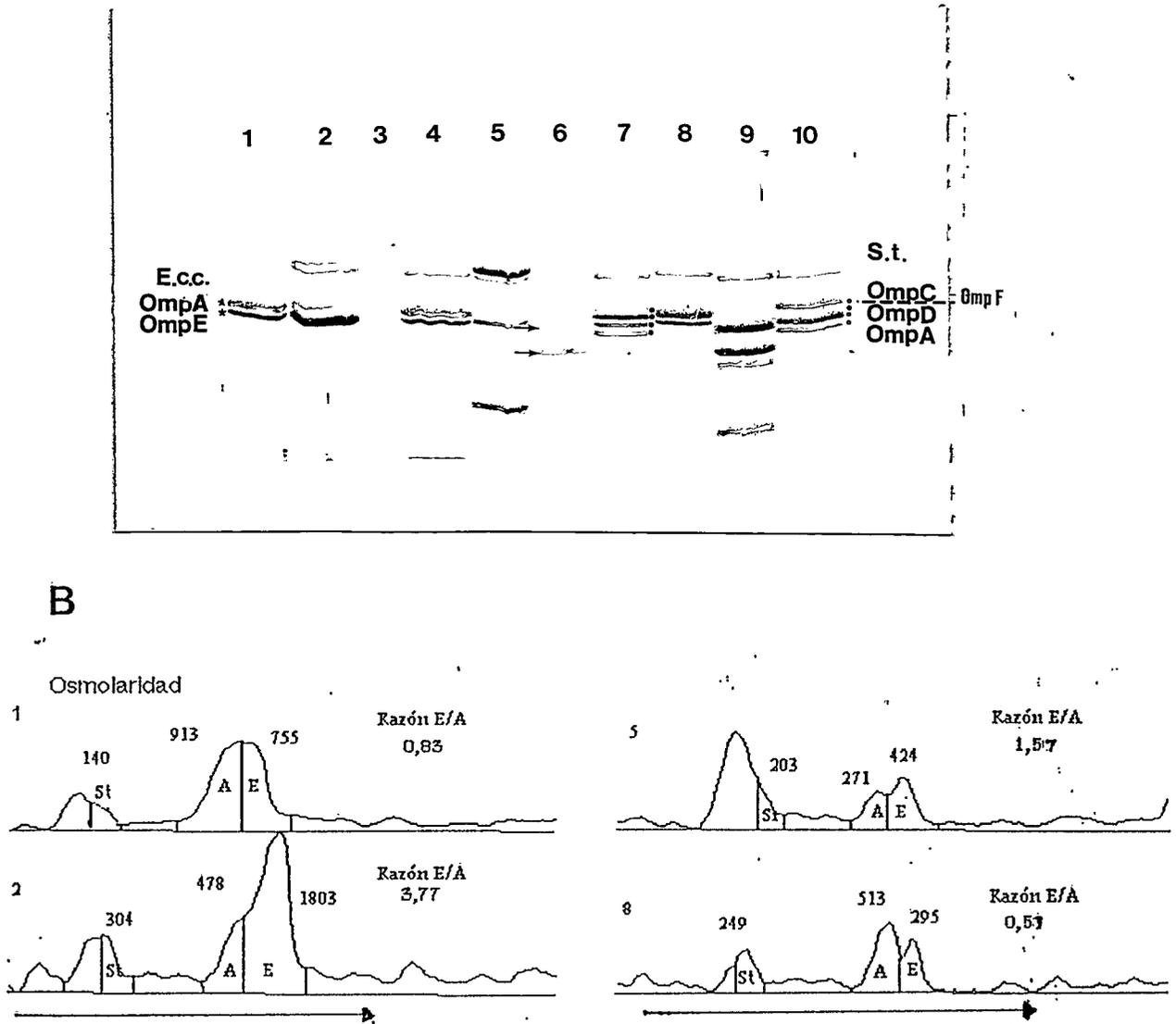


Figura 14. Electroforetograma de proteínas de ME de *Ecc* 71, *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1(A) y densitometría de las proteínas de *Ecc* 71. Efecto de la osmolaridad del medio sobre la expresión de proteínas de ME.

(A) Extractos de ME de bacterias crecidas en medios de cultivo de distinta osmolaridad, fueron separados mediante PAGE-SDS al 12,5%. Carriles: 1, 2, 4, 5, y 8 *Ecc* 71; carriles 6 y 9 *E. coli* K12; carriles 7 y 10 *S. typhimurium* MS1. Los medios de cultivo utilizados en carriles: 1, medio A1- 5%NaCl; 2, medio A1; 5, 6, y 7 medio NB; 4, 8, 9 y 10 medio NB-0,57 M sacarosa. Símbolos como en la figura 12

(B) Densitometrías de las proteínas de ME de *Ecc* 71. La flecha indica la dirección de la corrida electroforética. Los carriles examinados se encuentran indicados al costado izquierdo y corresponden a aquellos de la figura (A). La banda marcada como St corresponde al estándar interno utilizado; A indica la proteína OmpA, y E la proteína OmpE. Se incluye la razón entre OmpE y OmpA en cada uno de los casos.

medio NB (carril 5); disminuye en A1-NaCl 5% (carril 1), y llega a ser menor que OmpA en el medio de alta osmolaridad NB-sacarosa 0,57M (carriles 4 y 8). Estos resultados fueron confirmados por las densitometrías mostradas en la figura 14 B, en donde se muestran los valores de la razón OmpE/OmpA para cada caso. En los casos de *E. coli* K12 y *S. typhimurium* MS1 se puede observar en la figura 14 A que las porinas OmpF y OmpC son producidas normalmente cuando estas bacterias son cultivadas en NB (carriles 6 y 7 respectivamente). En cambio, en el medio de alta osmolaridad NB-sacarosa 0,57M, se produciría la disminución de OmpF en *E. coli* K12 (carril 9), y casi la desaparición de ella en *S. typhimurium* MS1 (carril 10, ubicación entre OmpC y OmpA), mientras que por otro lado se observa el aumento de OmpC en ambos casos. De la observación de la figura 14, no se puede deducir la disminución de OmpF en *E. coli*, en medio de alta osmolaridad, debido a que se trata de una electroforesis en poliacrilamida-SDS y se produce una ineficiente separación entre OmpF y OmpC (figura 14, carriles 6 y 9), las que migran a la altura de OmpD de *S. typhimurium* (figura 14, carriles 7 y 10). Los resultados encontrados en estos controles están de acuerdo con lo establecido por Villarejo y cols., 1983.

1.6.2 Efecto de la temperatura sobre la expresión de proteínas de la ME.

Ecc 71 fué crecida a 15 °C, 25°C y 28°C en los medios de cultivo A1, MP y CL; la temperatura considerada óptima para el crecimiento de *Ecc* es de 28°C. Se incluyó el cultivo de la cepa en medio mínimo A1 enriquecido con trozos de papas (MP), según se ha explicado en la sección 3 de Métodos, para tener un registro del efecto de la presencia de las células hospedantes sobre la expresión de proteínas de la ME. La figura 15 muestra los perfiles de proteínas de ME obtenidos de esta cepa y separados por PAGE-SDS al 12,5%. Los carriles 2, 3 y 4 contienen los

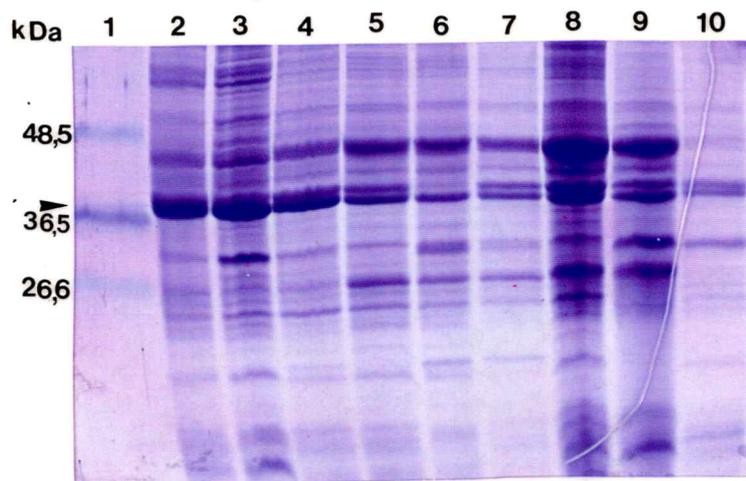


Figura 15. Electroforetograma de proteínas de ME de *Ecc 71*. Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la expresión de proteínas de ME. Los extractos de ME de la bacteria, fueron separados en un gel de poliacrilamida-SDS al 12,5%. Se muestra la zona de interés del gel.

El carril 1 contiene los mismos patrones de masas moleculares que la figura 12. Temperatura de crecimiento de las bacterias: Carriles 2, 5 y 8 a 15°C ; carriles 3, 6 y 9 a 25°C ; carriles 4, 7 y 10 a 28°C. Medios de cultivo: Carriles 2, 3 y 4 en Medio A1; carriles 5, 6 y 7 en Medio MP ; carriles 8, 9 y 10 en CL . La cabeza de flecha indica la migración del doblete OmpA/OmpE de *Ecc 71*.

extractos de ME de *Ecc 71* crecidas en el medio A1, a temperaturas de 15°C, 25°C y 28°C respectivamente; los carriles 5, 6 y 7 contienen los extractos de ME de *Ecc 71* crecidas en el medio MP a temperaturas de 15°C, 25°C y 28°C; mientras que los carriles 8, 9 y 10 contienen los extractos de ME de esta bacteria crecida en CL a temperaturas de 15°C, 25°C y 28°C respectivamente.

Se calculó la razón OmpE/OmpA de la ME de *Ecc* 71 crecida en cada una de las condiciones indicadas en la figura 15, mediante densitometría de estas bandas de proteínas comparadas con un estándar interno. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de la razón OmpE/OmpA de la ME de *Ecc* 71 crecida bajo diferentes condiciones de temperatura y medios de cultivo.

Medios de cultivo	Temperatura de crecimiento		
	15°C	25°C	28°C
Medio Mínimo A1	9,00	2,76	1,62
Medio Papas (MP)	1,43	1,87	1,31
Caldo Luria (CL)	0,77	1,30	1,13

Cálculos realizados a partir de las áreas obtenidas para cada una de las proteínas, medidas por densitometría del gel mostrado en la figura 15.

Según los valores encontrados para la razón OmpE/OmpA de *Ecc* 71, cuando las bacterias son crecidas en el medio de A1 se produce la mayor expresión de OmpE con respecto a OmpA si la temperatura es de 15°C, disminuyendo un 69,4% a temperatura de 25°C y un 82% a temperatura de 28°C, con respecto al valor encontrado para 15°C. Si el cultivo de las bacterias se realiza en el medio MP, la razón OmpE/OmpA aumenta 30,76% si la temperatura se eleva de 15°C a 25°C y disminuye en un 8,4% con respecto al valor alcanzado a 15°C si la temperatura de crecimiento es de 28°C. Por otra parte, cuando las bacterias se encuentran en medio

CL el cambio de temperatura de 15°C a 25°C incrementa un 68,8% la razón OmpE/OmpA y sólo 46,0% si la temperatura es de 28°C. En todas las condiciones señaladas, la expresión de OmpE es mayor que OmpA, excepto en Caldo Luria a 15°C en el cual OmpA es mayor que OmpE.

1.6.3 Efecto del medio de cultivo en la expresión de proteínas de la ME.

Ecc una bacteria que ha sido encontrada en ríos, océanos, aerosoles y lluvia, en el suelo, en la superficie de las papas y en el interior de ellas; es capaz de adaptarse a condiciones muy diferentes en cuanto a composición de medios de cultivo (Cappaert y cols., 1988). Para determinar si el medio en que se desarrolla esta bacteria es importante en la regulación de la expresión de proteínas de su membrana externa, se cultivó *Ecc* 71 en medio mínimo A1, en A1 enriquecido con papas (MP), en medio NB, NB-sacarosa, medio CL y en papas, y se estudió el perfil de proteínas de ME separadas en PAGE-SDS 12,5%, se calculó la concentración de proteína OmpE en relación a OmpA mediante densitometría del electroforetograma y se analizaron dichas proteínas mediante "immunoblot" contra suero anti-OmpC de *S. typhi*.

La figura 16 A muestra el electroforetograma de las proteínas de ME de las bacterias cosechadas desde estos medios de cultivos. Se observa que, el perfil de proteínas de las bacterias obtenidas directamente desde papas es el más pobre en proteínas, presentándose casi exclusivamente las proteínas que hemos nombrado como OmpE y OmpA. En el medio de cultivo mínimo A1 (carril 1), se observa una gran expresión de OmpE comparada con la de OmpA; en cambio, cuando el medio A1 es enriquecido con papas (carril 4) hay una disminución ostensible de OmpE llegando a ser menor que OmpA; en el medio NB (carril 2) disminuye OmpE con respecto a lo

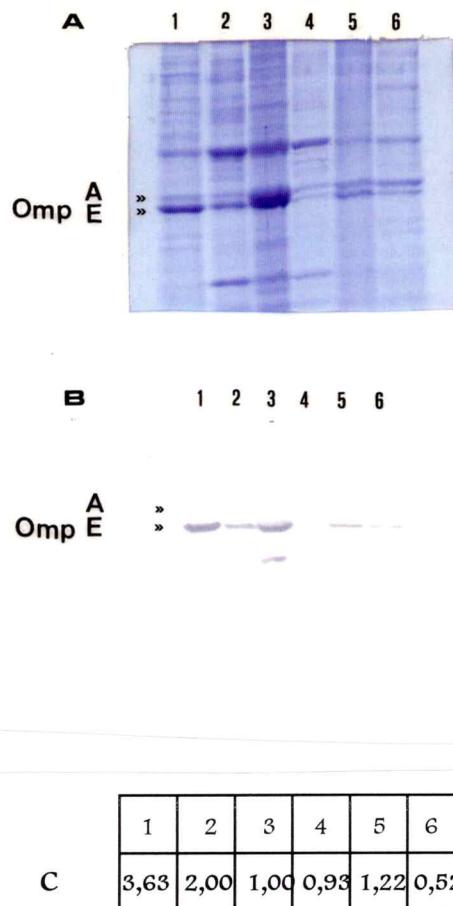


Figura 16. Electroforetograma de proteínas de ME de *Ecc 71* (A) e “immunoblot” correspondiente, frente a suero antiporina OmpC de *S. typhi* (B), valores de la razón OmpE/OmpA obtenidos de la densitometría de este electroforetograma (C). Efecto del tipo de medio de cultivo, sobre la expresión de proteínas de ME de *Ecc 71*.

(A) Extractos de membrana externa de la bacteria crecidas en diferentes medios de cultivo fueron separados en PAGE-SDS 12,5%; Carril 1, Medio mínimo A1; carril 2, Medio NB; carril 3, Caldo Luria; carril 4, Medio-Papas (MP); carril 5, Papas; carril 6, Medio NB-sacarosa 0,57M.

(B) “Immunoblot” con suero antiporina OmpC de *S. typhi* del electroforetograma mostrado en (A). Los carriles contienen muestras semejantes que en (A).

(C) Valores obtenidos a partir de las áreas detectadas por densitometría, de las proteínas OmpE y OmpA, mostradas en el electroforetograma (A). Los valores indican la razón OmpE/OmpA encontrada para la expresión de estas proteínas en los diferentes medios de cultivo señalados en (A) y correspondientes a los carriles 1 al 6.

expresado en el medio A1. El perfil de proteínas de ME de las bacterias extraídas desde papas (carril 5) muestra que en estas condiciones las dos proteínas mayores tienen expresión casi equivalente; por otra parte, las bacterias crecidas en el medio NB-sacarosa, el de mayor osmolaridad entre todos los de este ensayo (carril 6), muestra menor expresión de la proteína OmpE con respecto a OmpA. Después de realizada la densitometría de las proteínas separadas en el gel de la figura 16 A, se calculó la razón OmpE/OmpA para cada uno de los medios de cultivo ensayados. Los resultados se encuentran en la parte C de la figura 16.

El "Immunoblot" de la figura 16 B muestra en todos los carriles la presencia de la proteína OmpE de *Ecc 71* la que es reconocida por el antisuero OmpC de *S. typhi*. Además, se observan bandas de menor masa molecular, las que podrían corresponder a formas degradadas de la misma proteína.

Podemos decir, que el tipo de medio de cultivo para el crecimiento de esta bacteria, modula en forma importante la expresión de al menos dos proteínas de membrana externa.

Ecc 71 es un fitopatógeno responsable de la pudrición blanda de muchas especies de plantas, la que realiza degradando enzimáticamente la pectina de las paredes celulares. Para conocer la influencia que pudiese tener este componente celular en la expresión de las proteínas mayores de la ME de *Ecc 71*, se hicieron cultivos de la bacteria en medio A1 (sin glucosa) conteniendo 0,2% de poligalacturonato de sodio, después de los cual se hicieron extractos de proteínas de ME. Se analizaron estas proteínas por PAGE - SDS al 12,5% y se determinó que los perfiles observados no diferían de aquellos obtenidos para estas bacterias crecidas en MP, esto es, en el mismo medio mínimo A1 conteniendo trocitos de papas (no se muestra).

1.6.4 Efecto de la disponibilidad de oxígeno sobre la expresión de proteínas de la ME.

Ecc 71 fue crecida en condiciones de anaerobiosis en Jarras Gas-Pack, a 28°C y en diferentes medios de cultivo. Después de 48 hrs. de incubación, fue cosechada y los extractos de ME estudiados mediante PAGE-SDS 12,5% y la razón OmpE/OmpA calculada mediante densitometría desde el electroforetograma. A modo de comparación, se estudiaron también los perfiles de proteínas de ME de *Ecc* 193 y de *S. typhi* bajo las condiciones de cultivo señaladas antes.

Los perfiles de proteínas se muestran en las figuras 17A y B. La Fig. 17A corresponde a la comparación de los perfiles de proteínas de *Ecc* 71 desarrollada en Medio A1, en condiciones de aerobiosis (carriles 3, 5 y 7) o de anaerobiosis (carriles 4, 6 y 8) y a diferentes temperaturas. En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos desde la densitometría del electroforetograma de la figura 17 A con respecto a la razón OmpE/OmpA para cada condición señalada.

Tabla 5. Valores de la razón OmpE/OmpA de la ME de *Ecc* 71 crecida bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno y temperatura.

Disponibilidad de Oxígeno	Temperatura de crecimiento		
	15°C	25°C	28°C
Aerobiosis	1,43	2,16	1,92
Anaerobiosis	2,64	1,94	2,62

Cálculos realizados a partir de las áreas obtenidas para cada una de las proteínas, medidas por densitometría del gel mostrado en la figura 17 A.

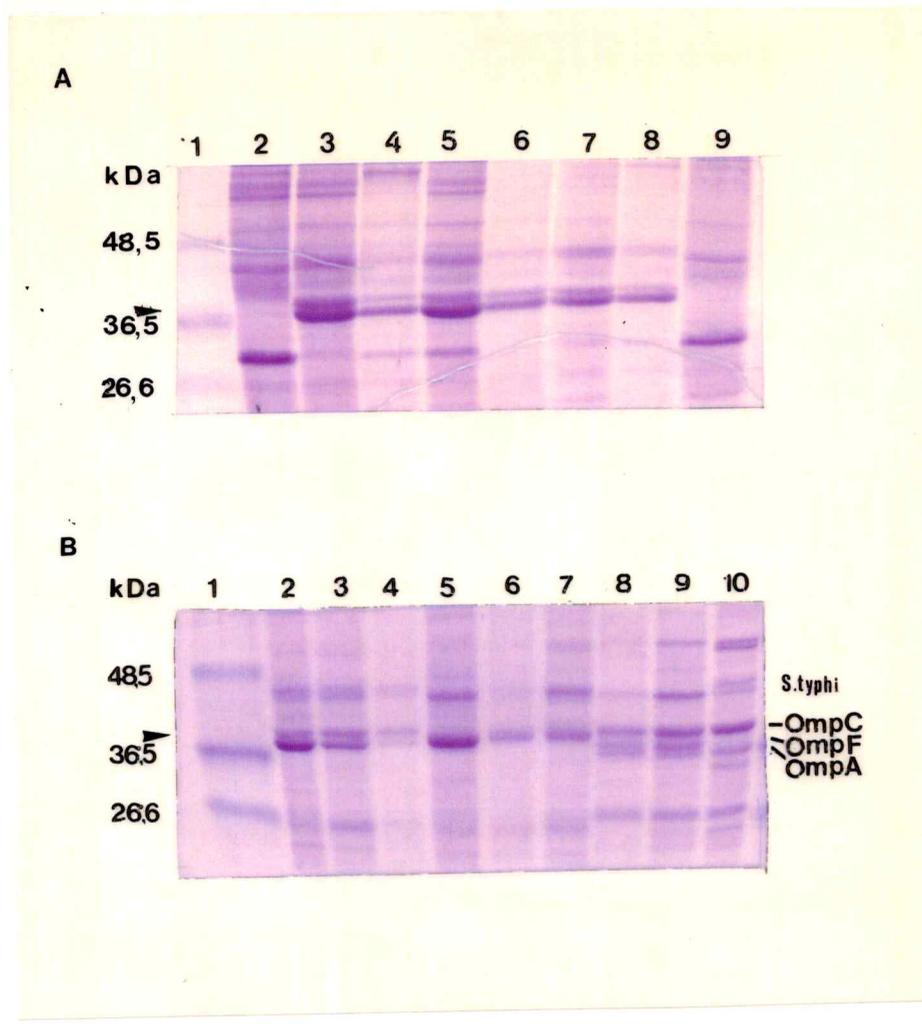


Figura 17. Electroforetograma de proteínas de ME de *Ecc 71* (A); y de *Ecc 71*, *Ecc 193* y *S. typhi* (B); Densitometría de las proteínas de ME de *Ecc 71* cultivada en anaerobiosis y en los medios A1,MP y CL.(C).

(A) Comparación de los perfiles de proteínas de ME de *Ecc 71* desarrollada en condiciones de distinta disponibilidad de oxígeno. PAGE-SDS al 12,5%, Carriles 2, 3, 5, 7 y 9, *Ecc 71* desarrollada en medio A1, en condiciones de aerobiosis; carriles 4, 6 y 8, *Ecc 71* desarrollada en medio A1, en condiciones de anaerobiosis; carriles 2, 3 y 4, cultivadas a temperatura de 15°C; carriles 5 y 6, cultivadas a temperatura de 25°C; carriles 7, 8 y 9, cultivadas a temperatura de 28°C. Carriles 2 y 9 contienen las muestras sin calentar. El carril 1 contiene los patrones de masas moleculares indicados en el costado izquierdo, similares a aquellos de la figura 12. La punta de flecha indica la zona de migración de OmpA y OmpE.

(B) Comparación de los perfiles de proteínas de ME de bacterias crecidas en anaerobiosis y en diferentes medios de cultivo. PAGE-SDS al 12,5%. Carriles 2, 3 y 4, cultivos anaeróbicos de *Ecc 71*; carriles 5, 6 y 7, cultivos anaeróbicos de *Ecc 193*; carriles 8, 9 y 10, cultivos anaeróbicos de *S. typhi*; carriles 2, 5 y 8, crecidas en medio A1; carriles 3, 6 y 9, en MP; carriles 4, 7 y 10 en CL. Al costado izquierdo se señalan los patrones de masas moleculares del carril 1 y la punta de flecha indica la zona de migración de OmpA y OmpE de *Ecc 71*. Al costado derecho se indica la ubicación de OmpC, OmpF y OmpA de *S. typhi*.

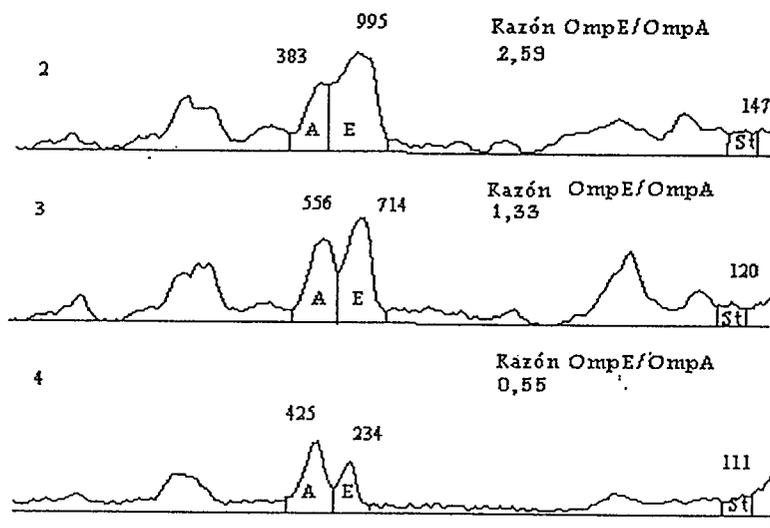


Figura 17 (C). Densitometría de las proteínas de ME de *Ecc 71* mostradas en el electroforetograma de la figura 17(B) y que corresponden a los carriles 2, 3 y 4. Éstos se encuentran indicados al costado izquierdo de la figura. Las muestras de ME fueron obtenidas de bacterias crecidas en anaerobiosis en los medios de cultivo A1, MP y CL respectivamente. Se señalan las proteínas OmpA y OmpE; y St corresponde a la banda de proteínas usado como estándar interno.

Según los resultados mostrados por la densitometría y la observación del electroforetograma de la figura 17 A, *Ecc 71* desarrollada en medio de cultivo A1 y en anaerobiosis muestra una mayor expresión de la proteína OmpE que OmpA en cualesquiera de las tres temperaturas estudiadas, sin embargo, se puede observar una disminución del 26,5% en la razón OmpE/OmpA cuando las bacterias son desarrolladas a 25°C comparadas con lo que ocurre a 15°C o a 28°C. Por el contrario, cuando el crecimiento se hace en aerobiosis la mayor expresión de OmpE se alcanza a 25°C, disminuyedo ésta si la temperatura del cultivo es de 15°C o de 28°C. Comparando ahora los patrones aerobiosis/anaerobiosis de las proteínas mostradas en el electroforetograma de la figura 17 A, se observa que en anaerobiosis se produce la

disminución en la expresión de un gran número de bandas en relación a las observadas en aerobiosis, sobre todo a temperaturas de 15°C y 25°C; en cuanto a la relación OmpE/OmpA aún cuando se aprecia una mayor cantidad de ellas en condiciones de aerobiosis, la relación entre estas dos proteínas se mantiene, expresándose OmpE en mayor proporción que OmpA.

La maceración del parénquima del tubérculo de papa es un proceso que se lleva a cabo en condiciones de baja tensión de oxígeno. Para probar si existe regulación en la expresión de las proteínas mayores de ME en *Ecc* 71 en condiciones de anaerobiosis ahora tomando en cuenta diferentes medios de cultivo, se crecieron las bacterias en medio de cultivo A1, CL, y en MP; a una temperatura de 28°C y en anaerobiosis. Se hicieron las preparaciones de ME y se analizaron en PAGE-SDS al 12,5%, la que se muestra en la figura 17B (carriles 2, 3 y 4). Se usaron como control de comparación las bacterias *Ecc* 193 (carriles 5, 6 y 7) y *S. typhi* (carriles 8, 9 y 10). El crecimiento de *S. typhi* se realizó en medio de cultivo A1 suplementado con cisteína y triptofano al 1% ("A1").

Al igual que en los casos anteriores, se hizo el análisis de las proteínas mediante densitometría. Se calculó la razón OmpE/OmpA para *Ecc* 71 crecida en anaerobiosis y en medio A1 como de 2,59 (carril 2); en el medio MP de 1,33 (carril 3), y para el medio CL de 0,55 (carril 4).

Estos resultados indican que la expresión de OmpE y OmpA no sólo es modulada por la disponibilidad de oxígeno sino que ésta se hace más notoria dependiendo del medio de cultivo en que se desarrolle *Ecc* 71, ya que a menor osmolaridad del medio (A1) la razón OmpE/OmpA es el doble que aquella en MP y casi 5 veces más que en CL. Con respecto a la expresión de la única proteína de la

cepa de *Ecc* 193 presente en la zona de las proteínas mayores, es menor en el medio MP (carril 6) y en CL (carril 7) con respecto al medio A1 (carril 5); en cuanto a *S. typhi*, ésta muestra el patrón típico de porinas OmpC, OmpF y la proteína OmpA, patrón en el cual se observa una represión completa de la porina OmpF en CL (carril 10), mientras se eleva la expresión de OmpC. Para esta última bacteria, no existen variaciones significativas en la expresión de estas proteínas tanto en medio "A1" (carril 8) como en A1 conteniendo papas (MP) (carril 9).

Estos resultados estarían indicando que la expresión de OmpE de *Ecc* 71 seguiría, más bien, el patrón de regulación de OmpF de *E. coli* o de *S. typhimurium* ya que está descrito, que en estas bacterias, esta proteína disminuye su expresión en anaerobiosis mientras OmpC sufre un aumento (Ni Bhriain y cols. 1989). Los resultados obtenidos, de los ensayos de regulación de la expresión de las proteínas mayores de *Ecc* 71, han sido resumidos en la tabla 6 considerando la razón OmpE/OmpA como >1 , 1 y <1

Tabla 6.- Expresión de las proteínas de ME OmpE/OmpA de *Ecc* 71 dependiendo de la osmolaridad, temperatura, medio de cultivo y disponibilidad de oxígeno del medio.

Medios de cultivo de las bacterias	Disponibilidad de oxígeno	Temperatura de crecimiento		
		15°C	25°C	28°C
Mínimo de sales A1	Aerobiosis	> 1	> 1 (2)*	> 1 (4)*
	Anaerobiosis	> 1	> 1	> 1 (2)*
A1 + Papas (MP)	Aerobiosis	> 1	> 1	> 1
	Anaerobiosis	--	--	> 1
Caldo Luria (CL)	Aerobiosis	< 1	> 1	1
	Anaerobiosis	--	--	< 1
Nutrient Broth (NB) NB + sacarosa 0,57M A1 + 5% NaCl	Aerobiosis	--	--	> 1 (2)*
	Aerobiosis	--	--	< 1 (2)*
	Aerobiosis	--	--	< 1

Los valores indican que la razón OmpE/OmpA es $= 1$; >1 o es < 1 .

(*)* corresponde al número de mediciones; (--) sin registros densitométricos.

1.7 Determinación de la sensibilidad a antibióticos de *Ecc* 71.

Dado que los ensayos de transformación y de transducción que se realizarían con la cepa *Ecc* 71 requerían de la selección de clones resistentes a ampicilina y tetraciclina respectivamente, se hizo necesario determinar la sensibilidad de ésta a dichos antibióticos.

Los ensayos fueron realizados usando la técnica de dilución seriada de los antibióticos en medio CL. Después de la incubación por 24 hrs a una temperatura de 28°C, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los antibióticos mencionados, para la cepa *Ecc* 71, como así también para otros antibióticos de uso rutinario, resultados que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. MICs para la cepa *Ecc* 71 mediante el procedimiento de dilución en caldo.

Antibiótico	MIC (ug/mL)
Ampicilina	>500
Carbenicilina	>500
Cefaloridina	15,62
Kanamicina	250

Antibiótico	MIC (ug/mL)
Cloranfenicol	7,8
Tetraciclina	1,56
Eritromicina	>200
Ac.nalidíxico	1,5

Debido a la gran resistencia mostrada por *Ecc* 71 a ampicilina, en este medio de cultivo, se repitió el ensayo esta vez en placas Petri conteniendo Agar Luria (AL) o medio mínimo A1 en estado sólido (AA1) y diferentes concentraciones de antibiótico. El resultado en AL fué similar al mostrado en la tabla 7, mientras que en AA1 las bacterias fueron inhibidas a una concentración de 400 µg/ml (MIC), por lo cual, los ensayos de selección de clones resistentes a ampicilina fueron realizados en AA1 conteniendo 600 µg/ml del antibiótico. Cuando fue necesario cultivar los clones seleccionados en medio AL, se hizo a una concentración de 1000 µg/ml.

1.8. Efecto del gen *micF* de *S. typhi* en la expresión de proteínas de ME de *Ecc 71*

Después de haber analizado la expresión de proteínas de ME de *Ecc 71* crecida en diferentes condiciones de cultivo, de encontrar que una de ellas reaccionaba positivamente ante los anticuerpos anti-OmpC de *S. typhi* y anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*; y la otra, particularmente a este último anticuerpo; de saber que las proteínas OmpC y OmpF de *Enterobacteriaceae* son extremadamente conservadas, y que presentan reacción cruzada frente a los anticuerpos contra estas dos proteínas, es que surgió la idea de poner a *Ecc 71* bajo la regulación del RNA antisentido, *micF* (RNA complementario que interfiere al mRNA de *ompF*), para poder discriminar si esta proteína que hemos denominado OmpE es funcionalmente más homóloga a OmpF que a OmpC.

Las porinas más estudiadas han sido las de *E. coli*, las que se ensamblan como trímeros en la ME. Estas proteínas forman canales acuosos que permiten el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas, a través de la barrera hidrofóbica producida por los componentes de la ME. Son relativamente similares en cuanto a estructura y función y quizás la mayor diferencia entre ellas radique en el diámetro de sus poros (OmpF = 1,2 nm; OmpC = 1,1 nm). Esta diferencia estructural, cobra enorme importancia en cuanto a la velocidad de difusión de nutrientes que puede penetrar a través de ellos, cuando estas bacterias se encuentran en determinadas condiciones de cultivo. Es así, que en condiciones de alta concentración de nutrientes, como en el caso del intestino, la proteína predominante es OmpC; mientras en agua fresca las bacterias presentan mayoritariamente OmpF.

En este estudio, se utilizó el plásmido pSTP2Kmic construido por I. Zaror (1989) el cual contiene el gen *micF* de *S. typhi* con sus dos promotores y además los tres promotores del gen *ompC* de *S. typhi* (Ver Apéndice).

Se aisló el plásmido a partir de *E. coli* JM109, y se transformó *Ecc* 71 por electroporación, según la técnica indicada en la sección 2.7 de Materiales y Métodos, con una eficiencia de 10^6 clones transformantes por 100 ng de DNA, los que fueron seleccionados en medio de cultivo A1 conteniendo 600 μ g de ampicilina/ml. Se aisló un clon 71 (pSTP2Kmic), del cual se extrajo DNA plasmidial, el que se muestra como DNA sobreenrollado en la figura 18 (carriles 5 y 6) y que corresponde a un tamaño lineal de 3900 pb aproximadamente (resultado no mostrado).

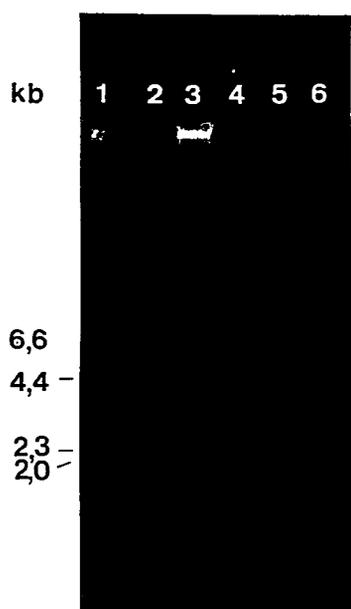


Figura 18. Electroforetograma del DNA plasmidial pSTP2Kmic, del clon transformante *Ecc* 71 (pSTP2Kmic). Electroforesis en agarosa 0,7%.

Carriles: 1, 5 y 6, preparaciones de DNA plasmidial de tres clones obtenidos de la transformación de *Ecc* 71 con pSTP2Kmic; carriles 2 y 4, preparaciones de DNA plasmidial de *Ecc* 71 sin transformar; carril 3, DNA de fago λ digerido con Hind III, como marcador de tamaño molecular.

Este plásmido fué utilizado posteriormente para transformar *E. coli* K12, mediante electroporación, de donde fue aislado el clon K12 (pSTP2Kmic) resistente a ampicilina.

Para examinar la regulación de porinas de *Ecc* 71 y compararlas con la del clon *Ecc* 71 (pSTP2Kmic), se crecieron las bacterias bajo diferentes condiciones de medio de cultivo (A1 y CL) y de temperatura (28°C y 37°C), y se extrajeron las proteínas de ME. Por otra parte, *E. coli* K12 y el clon *Ec* K12 (pSTP2Kmic) se crecieron en CL a 37°C, para ser usados como controles de la funcionalidad del gen *micF* de *S. typhi* presente en el plásmido pSTP2B1, que fue aislado desde *Ecc* 71 (pSTP2Kmic).

En la figura 19A se comparan los perfiles de proteínas de ME del clon *Ecc* 71 (pSTP2Kmic) con el de *Ecc* 71 sin este plásmido, crecidos en diferentes medios de cultivo y bajo distintas temperaturas; la separación de proteínas se realizó mediante PAGE-SDS 12,5%. Cabe recordar que la posición de las dos proteínas principales de ME de *Ecc* 71 se invierte según sea el tipo de PAGE que se utilice. Al hacer el análisis de las proteínas separadas por PAGE-SDS observadas en la figura 19 A, se aprecia que *Ecc* 71 desarrollada en medio de cultivo A1, ya sea a 28°C (carril 2) como a 37°C (carril 6) expresa principalmente la proteína OmpE si se compara con la cantidad de proteína OmpA presente. Pues bien, el clon *Ecc* 71(pSTP2Kmic) desarrollado en medio mínimo A1 a 28°C (carril 3) o en A1 a 37°C (carril 7) estaría reprimiendo la expresión de la proteína OmpE, si se compara con la cantidad de ésta en la cepa sin pSTP2Kmic y en las mismas condiciones de crecimiento (carriles 2 y 6 respectivamente). Por otro lado, la relación OmpE-OmpA en la ME de *Ecc* 71 desarrollada en CL, aparece como de 1:1 en ambas temperaturas (carriles 4 y 8 respectivamente), mientras que el clon *Ecc* 71(pSTP2Kmic) muestra la disminución en

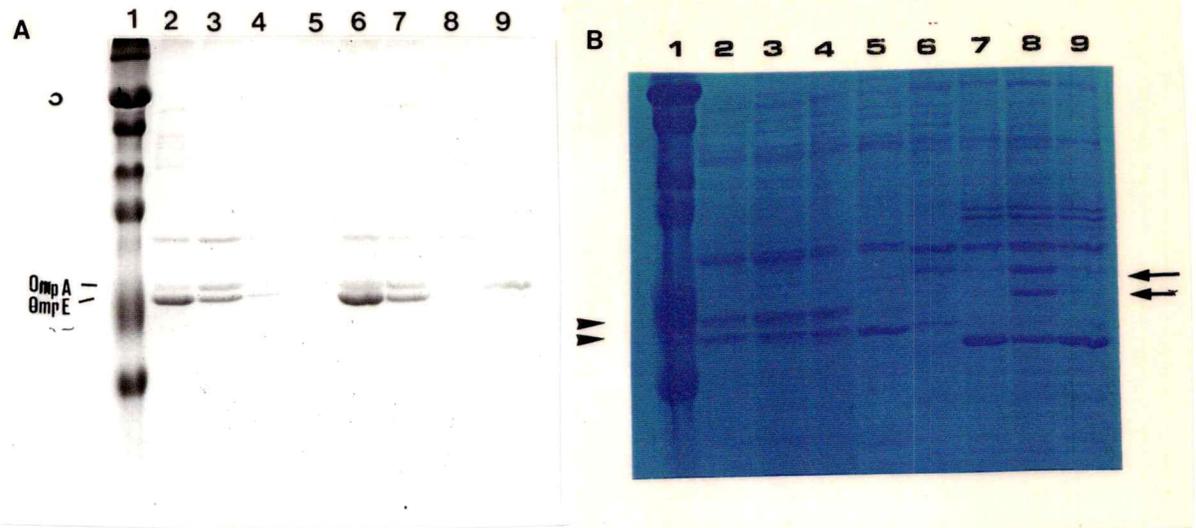


Figura 19. Electroforetograma de proteínas de ME separadas en PAGE-SDS al 12,5% (A), y en PAGE - SDS- urea (B). Efecto del gen *micF* en la regulación de la expresión de porinas de la ME.

(A) Proteínas de ME de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71 y clon *Ecc 71* (pSTP2Kmic) desarrolladas bajo diferentes condiciones de medio de cultivo y temperatura.

Carril 1: Marcadores de masas moleculares preteñidos descritos en la figura 12; carriles 2, 4, 6 y 8: *Ecc 71*; carriles 3, 5, 7 y 9: clon *Ecc 71* (pSTP2Kmic); carriles 2, 3, 6 y 7: bacterias crecidas en Medio Mínimo A1; carriles 4, 5, 8 y 9: bacterias crecidas en Caldo Luria; carriles 2, 3, 4 y 5: bacterias crecidas a 28 °C; carriles 6, 7, 8 y 9: bacterias crecidas a 37°C.

Al costado izquierdo se encuentran indicadas las proteínas de *Ecc*.

(B) Proteínas de ME de *Ecc 71* (pSTP2Kmic) y *E. coli* K12 (pSTP2Kmic) crecidas en CL, excepto en el carril 4, y a temperatura de 37°C.

Carril: 1, Marcadores de masas moleculares preteñidos. Carril 2: *Ecc 71*; carril 3: *Ecc 71* crecida en una concentración subinhibitoria de ampicilina; carril 4: clon *Ecc 71* (pSTP2Kmic) crecido en medio A1; carril 5: clon *Ecc 71* (pSTP2Kmic); carril 6: *E. coli* 4105 (*ompF* :: Tn5); carriles 7 y 9: clon *E. coli* K12 (pSTP2Kmic); carril 8: *E. coli* K12.

Las cabezas de flechas del costado izquierdo indican la posición de OmpE (superior) y OmpA (inferior), de *Ecc 71*. Las flechas del costado derecho indican la posición de OmpC (superior) y OmpF (inferior), de *E. coli* K12.

la expresión de OmpE con respecto a la de OmpA, la que en términos absolutos parecería ser menor que la observada en Medio A1 aunque en medio CL se observa una mayor reducción relativa OmpE/OmpA cuando la temperatura de desarrollo de la bacteria es a 37°C.

Ahora bien, como este resultado no parecía tan rotundo, como el que se esperaría de la regulación promovida por un plásmido multicopias como pSTP2Kmic, y para probar la funcionalidad de éste, se aisló el DNA plasmidial del clon *Ecc* 71 (pSTP2Kmic) y se transformó *E. coli* K12 por electroporación. Los clones transformantes fueron seleccionados en Agar Luria (AL) conteniendo ampicilina 50 µg/ml, obteniéndose una eficiencia de transformación de 10^5 /100 ng de DNA. Uno de los clones transformantes elegidos, *Ec* K12(pSTP2Kmic), fué cultivado en CL a temperatura de 37°C, extraídas sus proteínas de ME y analizadas en PAGE-SDS-urea .

En la figura 19B se comparan los perfiles de proteínas de ME separadas en PAGE-SDS-urea, de *Ecc* 71 y *E. coli* K12, sin pSTP2Kmic y clones pSTP2Kmic crecidos a una temperatura de 37°C. Las proteínas de ME del clon *Ecc* 71(pSTP2Kmic) crecido en CL y a 37°C (carril 5) se comparan con las del mismo clon crecidos a dicha temperatura pero en el medio mínimo A1 (carril 4), observándose la disminución casi total de la banda de proteína OmpE señalada con la flecha superior al lado izquierdo de la figura. El carril 2 contiene las proteínas de *Ecc* 71 sin pSTP2Kmic, mientras el carril 3 contiene las proteínas de esta misma cepa crecida en condiciones subinhibitorias de ampicilina (400 µg/ml); este control se hacía necesario ya que en ensayos anteriores, en este trabajo, se había observado una pequeña disminución de OmpE con respecto a OmpA si las bacterias eran crecidas en presencia de ampicilina, así el clon *Ecc* 71(pSTP2Kmic) tendría que cultivarse en presencia del

antibiótico para mantener la presión selectiva sobre el plásmido que contenía *micF*.

Como se ha informado antes, los niveles de las dos principales proteínas de *Ecc 71* son muy parecidos cuando el cultivo se realiza en CL, hecho que cambia ostensiblemente si el clon conteniendo pSTP2Kmic es desarrollada en CL (carril 5). En los carriles 6, 7, 8 y 9, se muestran los efectos de la presencia del *micF* de *S. typhi* en la proteína OmpF de *E. coli* K12. Los carriles 7 y 9 contienen las proteínas de ME del clon *E. coli* K12 (pSTP2Kmic), comparadas con las de *E. coli* K12 sin plásmido (carril 8), y con las de *E. coli* MC4105 (*ompF* :: Tn5) usada para identificar la posición de OmpC de *E. coli* K12 (carril 6), todas ellas desarrolladas en CL y a temperatura de 37°C.

Tabla 8.- Valores de la razón OmpE/OmpA de ME de *Ecc 71* parental y del clon *Ecc 71* (pSTP2Kmic), y de OmpF/OmpC de ME de *E. coli* K12 parental y del clon *E. coli* (pSTP2Kmic) obtenidos de las densitometrías del PAGE-SDS-urea de la figura 19 B.

Carriles	2	3	4	5
Bacteria	<i>Ecc 71</i>	<i>Ecc 71</i>	<i>Ecc 71</i>	<i>Ecc 71</i>
pSTP2Kmic	-	-	+	+
Medio de cultivo	CL	CL + Amp.	A1	Cl
Razón OmpE/OmpA	1,29	2,45	1,40	0,23
Carriles	6	7	8	9
Bacteria	<i>Ec K12</i>	<i>Ec K12</i>	<i>Ec K12</i>	<i>Ec K12</i>
pSTP2Kmic	-	+	-	+
<i>ompF</i> ::Tn10	+	-	-	-
Razón OmpF/OmpC	0/2,07	0,40	0,80	0,42

Cálculos realizados a partir de las áreas obtenidas para cada una de las proteínas, obtenidas por densitometría del electroforetograma 19 B.

Según los resultados observados en los electroforetogramas mostrados en la figura 19 B, y las razones OmpE/OmpA calculadas para *Ecc*, la presencia de *micF* en *Ecc* 71 disminuye la expresión de OmpE (carril 5) cultivada en CL, así como cuando es cultivada en A1 (carril 4) si se le compara con la expresión de OmpE en *Ecc* 71 carente de tal plásmido (carril 2 de la figura 19 A). Los resultados obtenidos con respecto a la inhibición de la expresión de OmpF en *E. coli* K12 (carriles 7 y 9) transformado con pSTP2Kmic obtenido de *Ecc* 71 (pSTP2Kmic) confirmaron la funcionalidad del plásmido.

Dado estos resultados, la proteína que ha sido denominada OmpE en este trabajo, perteneciente a la cepa 71 de *Ecc* estaría bajo la regulación negativa de *micF*, resultado que estaría contribuyendo a su posible identificación como OmpF de *Ecc* 71.

2.- Obtención de mutantes de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* mediante recombinación homóloga.

Como se indicó en la Introducción, la estrategia que se escogió para estudiar el efecto de la falta de una proteína de membrana externa en la virulencia de *Ecc* 71, fué la mutagénesis de esta cepa mediante recombinación homóloga entre el cromosoma de *Ecc* 71 y un segmento de DNA cromosómico de *S. typhimurium* conteniendo una inserción Tn 10 en un gen conocido, segmento de DNA que fue transducido mediante el fago P22. Se dispuso de un grupo de cepas de *S. typhimurium* con inserciones Tn 10 en genes cromosómicos, perteneciente al cepario del Dr. Mora, de las cuales se escogieron las que son detalladas más adelante.

2.1 Producción de lisados de *S. typhimurium* mediante el fago P22.

Los lisados producidos por P22 se obtuvieron como se indicó en la sección 2.6.1 de Materiales y Métodos. Se prepararon lisados a partir de las cepas de *S. typhimurium* MST2947 (*ompC* :: Tn 10), MST2944 (*ompD* :: Tn 10), MST221 (*guaB* :: Tn 10), MST264 (*thr* :: Tn 10), MST265 (*leu* :: Tn 10), MST297 (*tyrA* :: Tn 10), MST300 (*glyA* :: Tn 10). Los títulos alcanzados oscilaron entre 1×10^9 y 1×10^{10} fagos/ml, ensayados en *S. typhimurium* MS1.

2.2 Transducción de marcas a *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71.

La cepa de *Ecc* 71 fué crecida durante el día en medio A1 a 28°C, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,3 unidades de absorbancia. Se usó el método tradicional de transducción en líquido y el método de infección de la cepa receptora, sembrada como césped en medio CVP, con gotas de los lisados en ensayo depositadas en la superficie. Las placas se cultivaron a 28°C y se esperó hasta un máximo de 7 días para observar el desarrollo de clones. Se realizaron 14 series de transducciones utilizando el lisado de *S. typhimurium* (*ompC* :: Tn 10), 5 con el lisado (*ompD* :: Tn 10), 7 con el lisado (*tyrA* :: Tn 10), 4 con el lisado (*thr* :: Tn 10), 3 con el lisado (*leu* :: Tn 10), 2 con el lisado (*guaB* :: Tn 10) y 2 con el lisado (*glyA* :: Tn 10).

La selección de clones resistentes a tetraciclina se realizó en placas con medio de cultivo Cristal Violeta Polipeptato (CVP) conteniendo 3, 4, 5, 8 y 10 µg de tetraciclina por ml. Desde los primeros ensayos, la aparición de clones resistentes estuvo limitada a las placas con transducción en gotas, por lo que esta técnica fué la usada en todas las transducciones posteriores.

Sólo se obtuvieron clones resistentes en las transducciones realizadas con el lisado *ompC* :: Tn10, en las placas de CVP, conteniendo 3 µg de tetraciclina/ml, y utilizando la técnica de transducción en gotas. Los clones seleccionados fueron de dos tipos, aquéllos que se encontraban en una depresión del medio de cultivo, demostrando que eran productores de pectinasas, rasgo característico de *Ecc 71*; y otros que no lo hacían. La selección adicional de clones negativos en la producción de pectinasas se hizo pensando en la posibilidad que la introducción de una mutación pudiera haber alterado de alguna manera la producción o la exportación de estas enzimas, características de esta bacteria y eso hiciera descartarlas como *Ecc 71*, antes de realizar el análisis de ellos.

Del total de transducciones realizadas, se aislaron 20 clones resistentes a tetraciclina : 4 de ellos pectinasa (-) y 16 pectinasa (+). Del análisis de algunas pruebas bioquímicas y fisiológicas mostradas anteriormente en la Tabla 3, como la producción de ácido en lactosa y sacarosa y la producción de acetoina en los clones mutantes, se determinó que todos los clones pectinasa (-) correspondían a salmonellas contaminantes, mientras aquellos (+) coincidían con las pruebas señaladas para erwinias. Se realizaron 3 ensayos control con *Ecc 71*, en los que se sembraron 50 ml de la cepa, en concentración 2×10^{10} bacterias/ml, en placas de CVP conteniendo 6; 4,5; 3; 1 y 0 µg de tetraciclina/ml para el aislamiento de mutantes espontáneas resistentes al antibiótico, y compararlas con los clones transductantes. Según se muestra en la Tabla 9, se obtuvieron un total de 17 clones resistentes a tetraciclina 3,0 µg/ml. La cepa creció en forma de césped a concentraciones bajo el MIC para esta cepa, y no se obtuvo crecimiento de la cepa por sobre los 3,0 µg del antibiótico/ml.

Tabla 9.-

Mutantes espontáneas de *Ecc 71* resistentes a tetraciclina.

Ensayo	Nº de colonias resistentes a:				
	0 µg/ml	1,0 µg/ml	3 µg/ml	4,5 µg/ml	6 µg/ml
1	Confluyente	Confluyente	5	0	0
2	Confluyente	Confluyente	7	0	0
3	Confluyente	Confluyente	5	0	0

El control de la eficiencia de la transducción con lisado *ompC* :: Tn10 se realizó con *S. typhimurium* MS1, obteniéndose 78 clones resistentes a 3 µg de tetraciclina/ ml en medio AL de una concentración de $3,8 \times 10^8$ bacterias / ml.

2.3 Análisis fenotípico de las mutantes tet^R de *Ecc 71*.

Un método de análisis de genes involucrados en el proceso de fitopatogenicidad, es la proposición de "caja negra" sugerida por Daniels (1984) que involucra mutagénesis al azar por uso de transposones, para el aislamiento de mutantes de virulencia reducida (Rvi⁻). Así, se han aislado distintos tipos de mutantes en *Erwinia* sp., las que han sido agrupadas en distintas clases, como por ejemplo: a) mutantes auxotróficas; b) mutantes de enzimas extracelulares; c) mutantes prototróficas no afectadas en la producción de enzimas extracelulares (Handa y cols., 1987); y d) mutantes de motilidad (Pirhonen y cols., 1991; Mulholland y cols., 1993).

En este estudio, se usó la estrategia de mutagénesis por recombinación homóloga entre un gen de *Ecc 71* y un gen de *S. typhimurium* con una inserción cromosómica de Tn10. El objetivo de la mutagénesis fué la obtención de mutantes de *Ecc 71* que hubiesen perdido una proteína de membrana externa .

Se realizó el análisis fenotípico de las mutantes según los siguientes aspectos:

2.3.1. Proteínas de Membrana Externa.

Cabe hacer notar que los únicos clones transductantes de *Ecc* 71 resistentes a tetraciclina fueron obtenidos en las transducciones realizadas con el lisado de P22 proveniente de *S. typhimurium* MST 2947 (*ompC::Tn10*). El análisis de proteínas de membrana externa de los 16 clones, realizado en PAGE-SDS, mostró que dichas bacterias carecían de una de las proteínas mayoritarias del perfil proteico de ME. Como se puede observar en la figura 20 (carriles 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 y 12), en todas las transductantes falta la misma proteína, la que corresponde a aquella de M_r 37,9 kDa de la cepa parental *Ecc* 71 (carril 5) y que ha sido denominada OmpE.

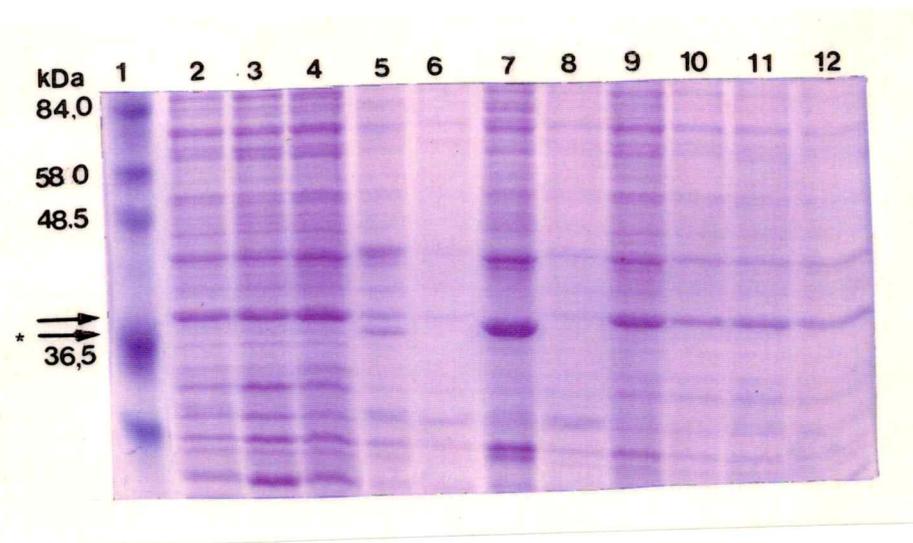


Figura 20. Perfil de proteínas de ME de clones mutantes $OmpE^{\ominus}$ de *Ecc* 71. Las proteínas fueron separadas mediante PAGE-SDS 12,5%.

Carril 1, patrones de masas moleculares mencionados en figura 12; carril 2, clon 311 $OmpE$ (-); carril 3, clon 19 $OmpE$ (-); carril 4, clon 20 $OmpE$ (-); carril 5, cepa parental *Ecc* 71; carril 6, clon 22 $OmpE$ (-); carril 7, cepa *Ecc* 193; carril 8, clon 511 $OmpE$ (-); carril 9, clon 615 $OmpE$ (-); carril 10, clon 711 $OmpE$ (-); carril 11, clon 811 $OmpE$ (-); carril 12, clon 911 $OmpE$ (-).

Símbolos: La flecha al costado izquierdo indica $OmpA$, y * → indica $OmpE$.

En el carril 7 se muestra el perfil de proteínas de *Ecc* 193, que presenta aparentemente solo una proteína mayoritaria en esa región y en este sistema de gels. De los 16 clones carentes de la proteína OmpE, se escogieron los 4 primeros clones aislados para proseguir con el trabajo y ellos fueron denominados : 311, 19, 20 y 22 (carriles 2, 3, 4 y 6).

El análisis del perfil de proteínas de ME de clones de *S. typhimurium* MS1, usados como controles, y obtenidos por transducción de fragmentos de DNA cromosómico de la cepa de *S. typhimurium* MST 2947 (*ompC* :: Tn10), indicó que estos clones carecían de la proteína OmpC en su membrana externa. En la figura 21 se muestra uno de tales clones (carril 2), comparado con su cepa parental MS1 (carril 1) en la que se indica la posición de la proteína OmpC.

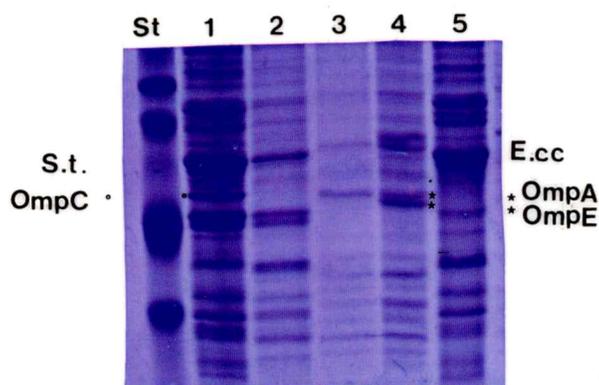


Figura 21. Perfil de proteínas de ME de clones mutantes OmpE (-) de *Ecc* 71, de *S. typhimurium* OmpC (-) y de sus respectivas cepas parentales. Las proteínas fueron separadas mediante PAGE-SDS 12,5 %.

Carril St, patrones de masas moleculares mencionados en la figura 12; carril 1, *S. typhimurium* MS1; carril 2, clon 5 *S. typhimurium* OmpC(-); carril 3, clon 311 OmpE (-) de *Ecc* 71; carril 4, *Ecc* 71 parental; carril 5, *S. typhimurium* MS1 muestra sin calentar.

En el carril 3 se muestran las proteínas de ME del clon mutante 311 de *Ecc 71* y en el carril 4 su correspondiente cepa parental. El carril 5 contiene la misma muestra que el carril 1, pero sin calentar.

Se realizó también el aislamiento de ME de los 17 clones de mutantes espontáneos resistentes a tetraciclina señalados más arriba, y se analizó mediante PAGE-SDS. Ninguno de ellos mostró pérdida de alguna de las dos proteínas mayoritarias de ME descritas anteriormente para *Ecc 71*, descartándose así la posibilidad que los clones OmpE⁽⁻⁾ hubiesen sido seleccionados entre mutantes espontáneos resistentes al antibiótico.

Para corroborar el hallazgo que los clones mutantes carecían de la proteína OmpE, se realizó el análisis de proteínas de ME de dichos clones frente a suero anti-OmpC de *S. typhi* y a suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*, después de la separación de proteínas en PAGE-SDS 12,5%, mostrado en la figura 22 A.

Se aprecia en la figura 22 B, que sólo una banda proteica en el carril 4 muestra reacción positiva frente al suero anti-OmpC, la cual corresponde a OmpE de la cepa parental *Ecc 71*, reacción inexistente en el resto de las muestras. En cambio, cuando se utiliza el suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium* (figura 22 C), se hacen evidentes tanto OmpE como OmpA en *Ecc 71* (carril 4) y sólo OmpA en las mutantes *Ecc 71* OmpE⁽⁻⁾ (carriles 1, 3, 5, 6 y 7) es reconocida por el suero anti-OmpF/OmpA. En el carril 2, de la figura 22 A, se observa claramente que la banda correspondiente a OmpA no migra en la posición que corresponde, cuando la muestra no es calentada a 100°C, mientras en la figura 22 C la reacción positiva con los anticuerpos anti-OmpA es muy débil (flecha), en una posición inferior a la que se observa en el resto de las muestras calentadas.

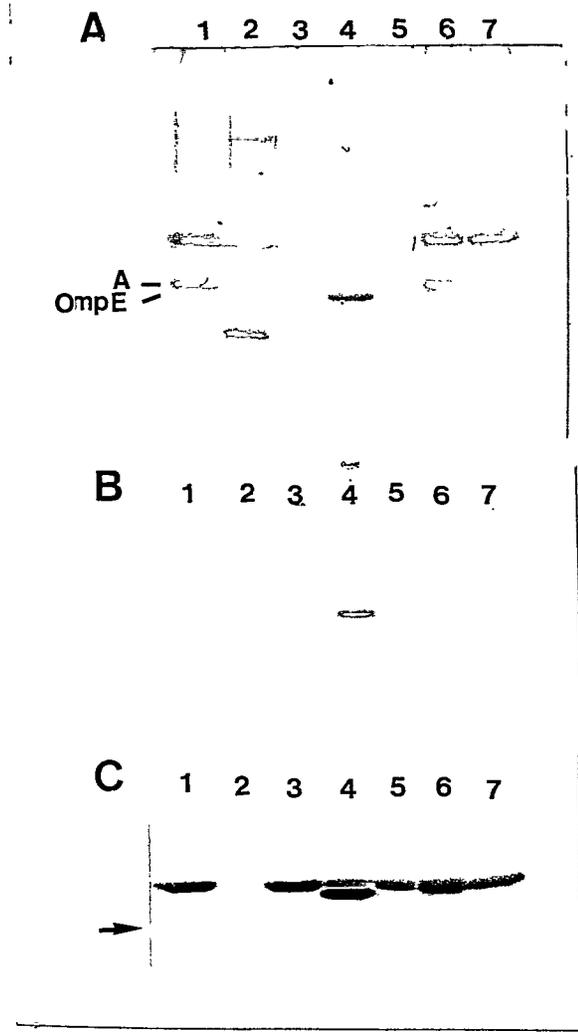


Figura 22. Electroforetograma de proteínas de ME de clones mutantes OmpE (-) de *Ecc* 71 (A); y su análisis mediante "immunoblots" contra suero anti-OmpC de *S. typhi* (B) y contra suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium* (C).

(A) Proteínas de ME de *Ecc* 71 y sus clones mutantes OmpE (-), fueron separadas mediante PAGE- SDS 12,5%.

Carril 1, clon 19 OmpE(-); carril 2, muestra sin calentar del clon 19 OmpE(-); carril 3, clon 311 OmpE (-) ; carril 4, *Ecc* 71; carril 5, clon 20 OmpE (-); carril 6, clon 21 OmpE (-); carril 7, clon 22 OmpE (-).

La posición de OmpA, OmpE y de OmpA sin calentar, se indican en el costado izquierdo.

(B) "Immunoblot" de las proteínas del electroforetograma(A) revelado con suero anti-OmpC de *S. typhi*. Las muestras contenidas en los carriles son las mismas que en (A)

(C) "Immunoblot" de las proteínas del electroforetograma(A) revelado con suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*. Las muestras contenidas en los carriles son las mismas que en (A).

La flecha del costado izquierdo indica la posición que ocupa OmpA, en la muestra sin calentar, del carril 2.

2.3.2 Características metabólicas de las mutantes *Ecc* 71 OmpE (-) tet^R.

Para conocer sus patrones metabólicos, los 4 clones mutantes en estudio fueron sometidas a las pruebas bioquímicas señaladas anteriormente en la Tabla 3. Ninguno de los clones mutantes mostró variación alguna respecto de la cepa parental *Ecc* 71, en relación a las características metabólicas típicas de su especie.

2.3.2.1 Auxotrofia.

Todas las cepas mutantes fueron capaces de crecer en el medio mínimo de sales A1, lo cual indicó que mantenían su calidad de prototróficas.

2.3.2.2 Resistencia a sales biliares.

Mutantes de *Erwinia* con alteración en la composición de su superficie celular pueden presentar sensibilidad a agentes de superficie, tal como, a las sales biliares (Mulholland y cols.1993).

Se cultivaron los clones mutantes OmpE [○] en el medio de cultivo McConkey el cual contiene sales biliares, no detectándose diferencias con respecto al cultivo de la cepa parental *Ecc* 71.

2.3.2.3 Velocidad de crecimiento.

Ecc 71 y los clones mutantes OmpE ⁽⁻⁾, se crecieron en el medio mínimo de sales A1, a una temperatura de 28°C y en constante agitación. Se midió la D.O.₆₀₀ de los cultivos, cada 60 min. durante 8 hrs. En la figura 23 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa parental y de sus clones mutantes. Cada punto es el promedio de 5 ensayos diferentes.

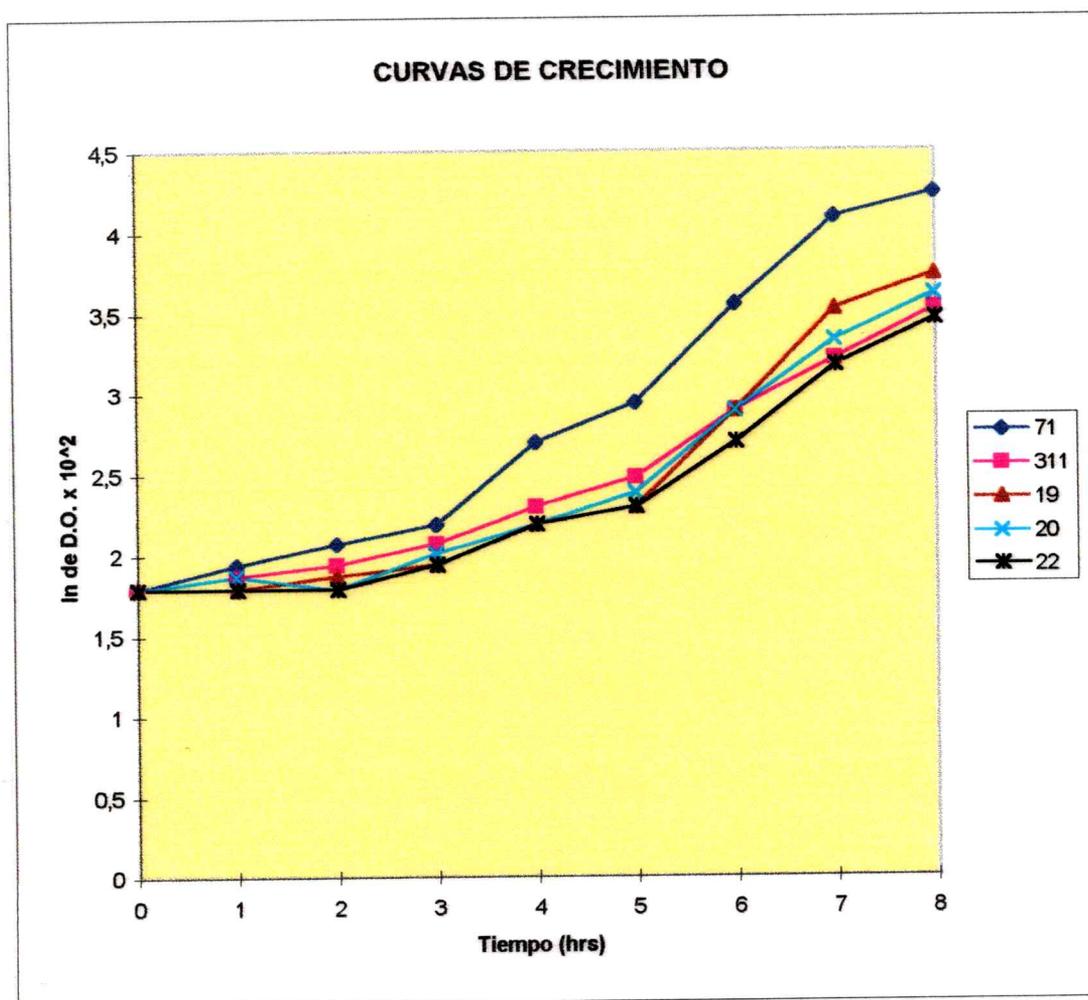


Figura 23. Curvas de crecimiento de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71 y clones mutantes OmpE (-) tet^R (311, 19, 20 y 22); crecidas en medio mínimo de sales A1, a 28°C y en constante agitación.

Segun el gráfico de la figura 23, los clones mutantes (311, 19, 20 y 22) presentan un menor crecimiento poblacional durante 8 horas de ensayo, comparados con la cepa parental (*Ecc* 71), y poseen una etapa lag más prolongada que *Ecc* 71. Entre los clones mutantes no existen mayores diferencias en cuanto al crecimiento de la población. Se realizó la conversión de unidades de DO al de bacterias viables, a partir de registros que se tenían con cultivos de las cinco bacterias hechas con ambos tipos de mediciones, y se pudo concluir que *Ecc* 71 alcanzó el doble de su población inicial en 3,0 hrs y 36 min de cultivo, mientras los clones 311 y 19 lo hacían en 5 hrs y los clones 20 y 22 necesitaban de 5 hrs y 12 min, y 5 hrs con 30 min respectivamente. Según los registros realizados al finalizar las 8 horas de cultivo, indicados en la tabla 10, la población alcanzada por el clon 311 es 2,13 veces menor que la de su cepa parental; para el clon 19 es 1,7 veces menor; para el clon 20 es 1,95 veces menor y para el clon 22 es 2,28 veces menor. El cálculo del tiempo de generación de estas cepas, se hizo con los datos de la parte lineal de cada una de las curvas respectivas, comprobándose que los clones mutantes requieren un tiempo más prolongado para su división celular (tabla 10), comparada con la cepa parental. En los casos de las cepas 19, 20 y 22 , el tiempo de generación se obtuvo del promedio de los cálculos efectuados de dos pendientes dentro de cada una de las curvas.

Tabla 10. Población alcanzada por *Ecc* 71 y clones mutantes *OmpE*(-) después de 8 hrs de cultivo, y tiempos de generación (Td).

Bacterias	<i>Ecc</i> 71	Clon 311	Clon 19	Clon 20	Clon 22
viables/ml	$6,1 \times 10^8$	$2,86 \times 10^8$	$3,58 \times 10^8$	$3,13 \times 10^8$	$2,68 \times 10^8$
Td (min)	106,611	151,673	131,986	141,507	151,784

2.3.2.4 Producción de exoenzimas.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* es una bacteria que posee la capacidad de secretar una variedad de enzimas al medio, entre las cuales se cuentan pectinasas, celulasas y proteasas. Estas enzimas le permiten la maceración de los tejidos del organismo hospedero. Mutaciones que afecten la síntesis o secreción de estas enzimas, llevan a que estas bacterias reduzcan o pierdan la virulencia (Andro y cols., 1984; Collmer y cols., 1986; Hinton y cols., 1989; Murata y cols., 1990; Reeves y cols., 1993).

Un método de análisis semicuantitativo, comúnmente usado para la determinación de la secreción de exoenzimas por estas bacterias, es el ensayo en placas conteniendo el medio de cultivo suplementado con el sustrato apropiado (Chatterjee y Starr, 1972; Hugouvieux-Cotte-Pattat y cols., 1989; Kamoun y Kado, 1990; He y cols., 1991; Jones y cols., 1993; Pirhonen y cols., 1993) .

Se realizó la detección de secreción de pectinasas, celulasas y proteasas de *Ecc* 71 y de los clones mutantes 311, 19, 20 y 22. Según se explicó en la sección 2.9 de Materiales y Métodos, cultivos de cada cepa, con una D.O.₆₀₀ igual a 0,07 fueron depositados en forma de gotas de 5 µl, en la superficie de placas con medio de cultivo apropiado, cuidando que las gotas no sufrieran deformación. Las placas para medir pectinasas contenían poligalacturonato de sodio; aquéllas para medir celulasas fueron suplementadas con carboximetilcelulosa; y, las utilizadas para medir proteasas contenían gelatina. Se realizaron 3 ensayos en paralelo con cada cepa y en cada uno de los sustratos, los que fueron incubados en aerobiosis y en anaerobiosis. Cada ensayo consistió en la incubación de 3 gotas de cultivo de cada cepa . En la Tabla 11, se encuentran los diámetros de los halos de hidrólisis alrededor

Tabla 11.- Producción de exoenzimas de *Ecc* 71 y clones mutantes OmpE(-)

	<i>Ecc</i> 71	<i>Ecc</i> 311	<i>Ecc</i> 19	<i>Ecc</i> 20	<i>Ecc</i> 22
Pectinasas					
aerob.	12,8 ± 0,6	6,8 ± 1,1	10,3 ± 0,6	10,8 ± 0,6	8,3 ± 0,6
r	--	0,53 ± 0,06	0,80 ± 0,001	0,84 ± 0,007	0,64 ± 0,015
anaerob.	13,0 ± 1,0	6,3 ± 0,6	8,5 ± 0,7	10,3 ± 0,6	8,0 ± 1,0
r	--	0,48 ± 0,008	0,65 ± 0,003	0,79 ± 0,013	0,61 ± 0,027
Celulasas					
aerob.	13,5 ± 0,8	6,3 ± 0,6	10,0 ± 1,0	8,3 ± 0,6	8,5 ± 0,7
r	--	0,46 ± 0,015	0,74 ± 0,028	0,61 ± 0,007	0,62 ± 0,013
anaerob.	13,6 ± 0,7	11,5 ± 0,7	8,8 ± 1,1	12,5 ± 0,7	11,8 ± 0,6
r	--	0,84 ± 0,007	0,64 ± 0,04	0,91 ± 0,003	0,86 ± 0,0005
Proteasas					
aerob.	14,7 ± 2,4	9,4 ± 0,8	12,2 ± 0,6	14,0 ± 1,5	13,0 ± 0,5
r	--	0,63 ± 0,05	0,82 ± 0,1	0,95 ± 0,05	0,88 ± 0,113
anaerob.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Promedio del diámetro de los halos de hidrólisis en mm ± el error estandar, de cultivos aeróbicos y anaeróbicos de un n = 9 .

r = promedio del diámetro de halos alcanzado por un clon mutante/ promedio del diámetro de halos alcanzado por la cepa parental *Ecc* 71, para cada una de las condiciones.

de las zonas de crecimiento bacteriano en mm, y que corresponden al promedio obtenido de 9 mediciones \pm el error estandar.

Las razones obtenidas entre los diámetros de hidrólisis de la cepa parental y los de los clones mutantes indican que existe una alteración en el poder hidrolítico de estos últimos comparado con el de la cepa parental, siendo importante el caso del clon 311, el cual prácticamente disminuye a la mitad la actividad pectinolítica tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y la actividad celulolítica en aerobiosis, mientras sólo disminuye en un 16% esta actividad en anaerobiosis. En cuanto al resto de los clones mutantes y sus actividades tanto pectinolíticas como celulolíticas, la disminución va desde un 9% hasta un 39% en relación estas actividades en la cepa parental. Cabe hacer notar, que no se pueden realizar comparaciones de las medidas de los halos en aerobiosis con los de anaerobiosis, ya que los primeros corresponden a 24 hrs. de crecimiento bacteriano en las placas con sustratos, mientras los últimos tuvieron que ser incubados durante 48 hrs por el lento desarrollo que presentan a dicha temperatura.

En cuanto a la secreción de proteasas, las medidas de halos no muestran diferencias significativas entre las cepas mutantes y parental, excepto en el caso del clon mutante 311 que ha perdido un 37 % de poder hidrolítico. Nunca se detectó la producción de halos de hidrólisis de gelatina, en condiciones de anaerobiosis, en ninguna de las cepas.

2.3.2.5 Sensibilidad a antibióticos .

Los ensayos fueron realizados usando la técnica de dilución seriada de los antibióticos en CL, y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del crecimiento microbiano, después de la incubación a 28°C por 24

hrs. La Tabla 12 muestra los MICs encontrados para los clones mutantes, de aquellos antibióticos en que los valores fueron distintos de los encontrados para la cepa parental.

Tabla 12.-

MICs de la cepa *Ecc 71* y clones mutantes ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>Ecc 71</i>	<i>Ecc 311</i>	<i>Ecc 19</i>	<i>Ecc 20</i>	<i>Ecc 22</i>
Cefaloridina	15,62	250	250	500	125
Cloranfenicol	7,8	25	25	25	25
Tetraciclina	1,56	6,25	6,25	6,25	6,25
Ac. nalidíxico	1,5	1,5	3,1	3,1	1,5

Los clones mutantes mostraron niveles semejantes de MICs para Ampicilina, Carbenicilina, Kanamicina, y Eritromicina que los de la cepa nativa *Ecc 71*. Sin embargo, todas ellas, además de la resistencia a tetraciclina adquirieron una resistencia importante a Cefaloridina y a Cloranfenicol, mientras los clones mutantes 19 y 20 además aumentaron su resistencia a Ac. Nalidíxico.

2.3.3 Morfología colonial.

Todas las mutantes en estudio, sembradas en diferentes medios de cultivo, conservaron siempre su aspecto suave y brillante como la cepa nativa. El ensayo de aglutinación con Solución de Tripaflavina 1% resultó negativo para todas ellas, confirmando que las mutantes conservan su estado colonial S y que no se ha producido una alteración en el LPS de ellas.

2.3.4 Motilidad.

Tanto la observación de preparaciones frescas al microscopio óptico de las mutantes *OmpE*[○], como su crecimiento en el medio de cultivo para ensayo de motilidad, Swarm Agar (sección 2.2.5 de Materiales y Métodos), preparado en A1 conteniendo 0,3% de agar (Wolfe y Berg, 1989), mostraron que no existían diferencias con respecto a la movilidad presentada por su cepa parental *Ecc 71*.

2.4 Detección de la inserción *Tn 10* en las mutantes *tet*^R de *Ecc 71*.

Para probar la presencia del transposon *Tn 10* en el DNA genómico de los clones de *Ecc 71* resistentes a tetraciclina se utilizó la técnica de amplificación de fragmentos de DNA mediante la Reacción de polimerización en cadena (PCR). Se diseñaron los iniciadores o "primers" OLITET 1 y OLITET 2 según se ha descrito en la sección 2.8.6 de Materiales y Métodos, pertenecientes a secuencias del gen *tetA* (gen de resistencia a tetraciclina de *Tn 10*), para amplificar un fragmento de DNA de 1.264 pb. Se utilizaron los DNA genómicos de *Ecc 71*, de los clones mutantes *tet*^R y de *S. typhimurium* MST 2947 y se siguió el programa de ciclos según se describió en Materiales y Métodos.

Los productos del PCR se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 0,7 %; (figura 24 A). En los carriles 1, 3, 4, 6 y 7 se muestran los productos de amplificación obtenidos desde DNA genómico de los clones *tet*^R 19, 22, 311, 20 y 4115 respectivamente; mientras en los carriles 2 y 8 se encuentra el correspondiente a la cepa parental *Ecc 71*; en el carril 5 se muestra el producto de amplificación del DNA genómico de *S. typhimurium* MST2947, la que posee una inserción *Tn 10* en el gen *ompC*. Los carriles 9 y 10 contienen los productos de PCR de lisados de bacterias *Ecc 71* como fuente de DNA para controles negativos; el carril 11 contiene un

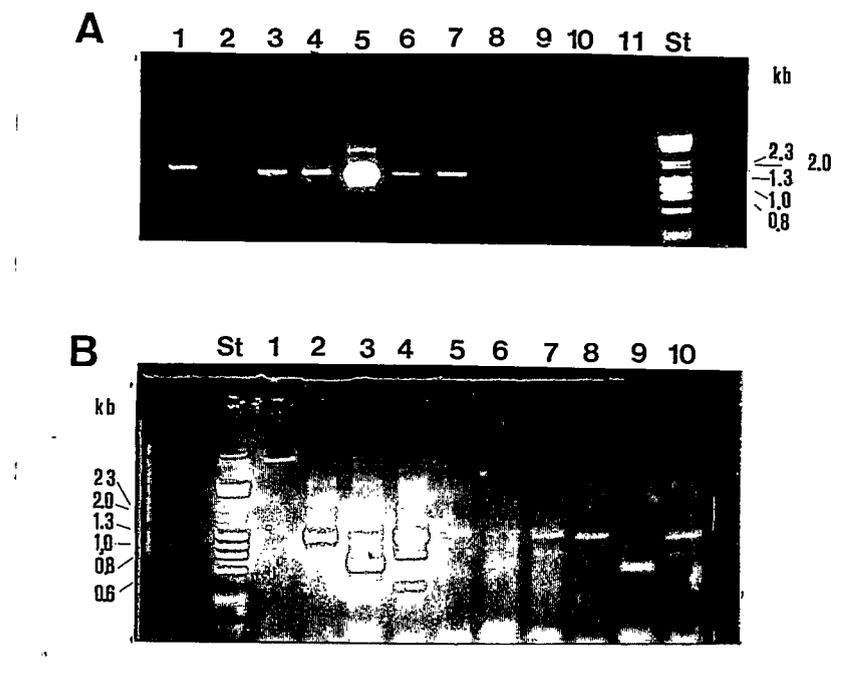


Figura 24. Análisis de productos de PCR, mediante electroforesis en agarosa al 0,7%

(A) Amplificados producidos a partir de DNA cromosómico de *Ecc 71*, de clones mutantes *tet^R* de *Ecc 71* (clones 19, 22, 311, 20 y 4115) y de *S. typhimurium* MST2947 *tet^R*.

Carril 1, clon 19 de *Ecc 71*; carril 2, *Ecc 71*; carril 3, clon 22 de *Ecc 71*; carril 4, clon 311 de *Ecc 71*; carril 5, *S. typhimurium* MST2947; carril 6, clon 20 de *Ecc 71*; carril 7, clon 4115 de *Ecc 71*; carril 8, *Ecc 71*; carriles 9 y 10, bacterias lisadas de *Ecc 71*; carril 11, control de DNA de 800 pb; carril St, DNA de los fagos λ -*Hind* III y ϕ X174-*Hae* III como estándares de tamaño molecular.

(B) Digestión de algunos de los productos de PCR presentados en (A).

Carriles 2, 3 y 4, *S. typhimurium* MST2947; carriles 5, 6 y 7, clon 19 de *Ecc 71*; carriles 8, 9 y 10, clon 311 de *Ecc 71*.

Carriles 3, 6 y 9, muestras digeridas con *Eco*RI; carriles 4, 7 y 10, muestras digeridas con *Sca*I; carril St, DNA de los fagos λ -*Hind* III y ϕ X174-*Hae* III como estándares de tamaño molecular.

fragmento de DNA purificado, de tamaño conocido, de 800 bp; y el carril marcado como St contiene los marcadores de tamaños moleculares en kb de DNA del fago λ -*Hind* III y de ϕ X174-*Hae* III. Se comprueba entonces, que las mutantes de *Ecc* 71 (carriles 1, 3, 4, 6 y 7) producidas por transducción de DNA genómico de *S. typhimurium* MST 2947 (carril 5), poseen el gen de resistencia a tetraciclina de *Tn 10* en sus cromosomas, información genética que no se encuentra presente en la cepa parental (carril 8). Por otra parte, el tamaño del fragmento amplificado en las mutantes está de acuerdo con aquel amplificado en la cepa donante (carril 5).

Como manera de corroborar los hallazgos presentados en la figura 24 A, se realizó la digestión de los fragmentos de DNA amplificados de dos de las mutantes, con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Sca*I, para compararlos con aquellos de *S. typhimurium* MST2947. Según la secuencia de bases de *tetA*, existe un sólo sitio de corte para *Eco*RI y que produce fragmentos de 631 pb y 661 pb, mientras *Sca*I produce fragmentos de 868 pb y 424 pb.

En la figura 24 B, se muestra la electroforesis en agarosa al 0,7%, del DNA producto de la amplificación por PCR, digerido separadamente con *Eco*RI y *Sca*I. En el carril 2 se muestra el DNA obtenido por amplificación de *S. typhimurium* MST 2947; y en los carriles 3 y 4, este mismo DNA digerido con *Eco*RI y con *Sca*I respectivamente. En los carriles 5 y 8 se corrió el amplificado de DNA de las mutantes 19 y 311 respectivamente; en los carriles 6 y 9 los digeridos de estos últimos DNAs con *Eco*RI; y en los carriles 7 y 10 los digeridos de estos mismos DNAs con *Sca*I. La presencia de bandas de DNA más intensas en los carriles 2, 3 y 4 que corresponden al control positivo, comparadas con las bandas de DNA de los clones mutantes 19 y 311 se debió a problemas en la concentración de las muestras.

En el carril 3 de la figura 24 B, se observa una doble banda que correspondería a los fragmentos de tamaño molecular de 631 pb y 661 pb generados por acción de *EcoRI* en el DNA amplificado de *S. typhimurium* MST2947, mientras que en los carriles 6 y 9 se observa una banda que corresponde a ese rango de tamaño molecular y pertenecientes a la digestión del DNA amplificado de los clones mutantes 19 y 311 respectivamente, producida por *EcoRI*.

En cuanto a la digestión de los amplificados de DNA con *ScaI*, en el carril 4 se observa una banda en el rango de 800 pb y otra de tamaño molecular menor que 600 pb que correspondería al fragmento esperado de 424 pb; así mismo y de manera más tenue se visualizan estas mismas bandas en los carriles que pertenecen a los clones mutantes 19 y 311, los carriles 7 y 10 respectivamente. En el carril 1 se encuentra el producto de PCR con DNA de *Ecc 71* como control negativo.

Como se puede observar, el tamaño de los fragmentos generados por la digestión de los DNAs amplificados de cada cepa mutante, con cada una de las enzimas de restricción, coinciden con aquellos generados por dichas enzimas en el DNA producto del PCR en *S. typhimurium* MST2947 .

Estos resultados estarían confirmando la existencia del transposón *Tn 10*, en las mutantes *tet^R* de *Ecc 71* denominadas 311, 19, 20 y 22.

2.5 Determinación de la virulencia de las mutantes *OmpE*⁽⁻⁾.

La virulencia de las mutantes de *Ecc 71* fue determinada mediante el ensayo de maceración del parénquima de tubérculo de papa y realizado según la técnica descrita en la sección 2.3.2 de Materiales y Métodos.

Cada tubérculo llevó al menos una inoculación de la cepa *Ecc* 71, usada como control interno de la producción de 100% de maceración y varias inoculaciones de cepas mutantes, cuyo número dependió del tamaño del tubérculo. Se realizaron controles en los que se practicaron 2 inoculaciones de *Ecc* 71 en el mismo tubérculo, para verificar si el grado de maceración era semejante. Los valores de maceración obtenidos son muy parecidos cuando se trata del mismo tubérculo, no así si se comparan entre tubérculos distintos (tabla 13).

Así, los registros de maceración se calcularon como porcentaje de maceración producido por cada clon mutante en relación a la maceración producida por *Rcc* 71 dentro del mismo tubérculo.

Tabla 13.- Valores de maceración producida por *Ecc* 71 inoculada en duplicado dentro del mismo tubérculo de papa.

Macerado producido (gramos)					
Inoculación	Tubérculos				
	1	2	3	4	5
A	1,8	1,5	0,7	1,9	1,0
B	1,7	1,5	0,9	2,0	0,9

Después de 48 hrs de incubación en cámara húmeda y a una temperatura de 28°C, las papas fueron cortadas por las zonas de inoculación y el tejido macerado fue recolectado y puesto en tubos Eppendorf para ser posteriormente pesado.

La figura 25 presenta el aspecto alcanzado por un tubérculo en las zonas de inoculación, después de 48 hrs de incubación con suspensiones de: *Ecc* 71 (A), clon mutante 311(B), y clon mutante 19 (C).

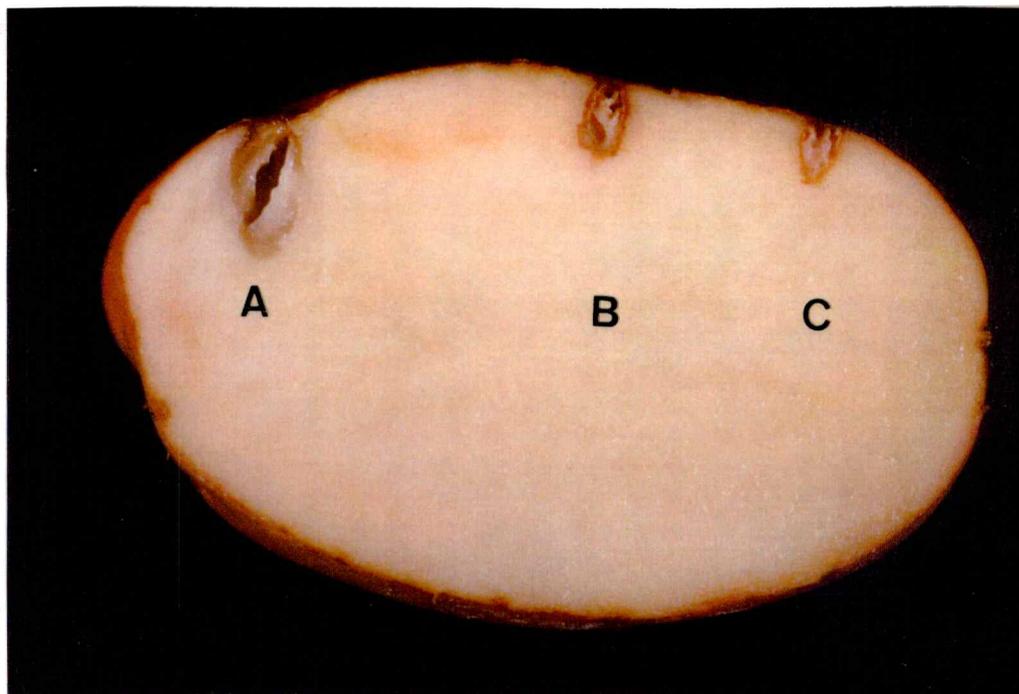


Figura 25. Corte por un tubérculo de papa, mostrando los sectores de maceración producidos por: (A) Ceba parental *Ecc* 71; (B) clon mutante 311 *OmpE*(-); y (C) clon mutante 19 *OmpE*(-).

En la tabla 14 se encuentran los porcentajes promedios de maceración (X) obtenidos por los clones mutantes *OmpE* \square en relación a la ceba parental *Ecc* 71. Entre paréntesis se indica en número de ensayos realizados en cada caso (N).

Tabla 14.-

Porcentajes de maceración exhibidos por los clones mutantes $OmpE^{(-)}$ de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71.

		Cepas				
		71	311	19	20	22
N		(50)	(35)	(35)	(27)	(20)
X		100	59,8	56,4	57,9	38,1
&		0	$\pm 12,6$	$\pm 12,2$	$\pm 15,1$	$\pm 14,2$

N= N° casos

X = Media

& = Error St.

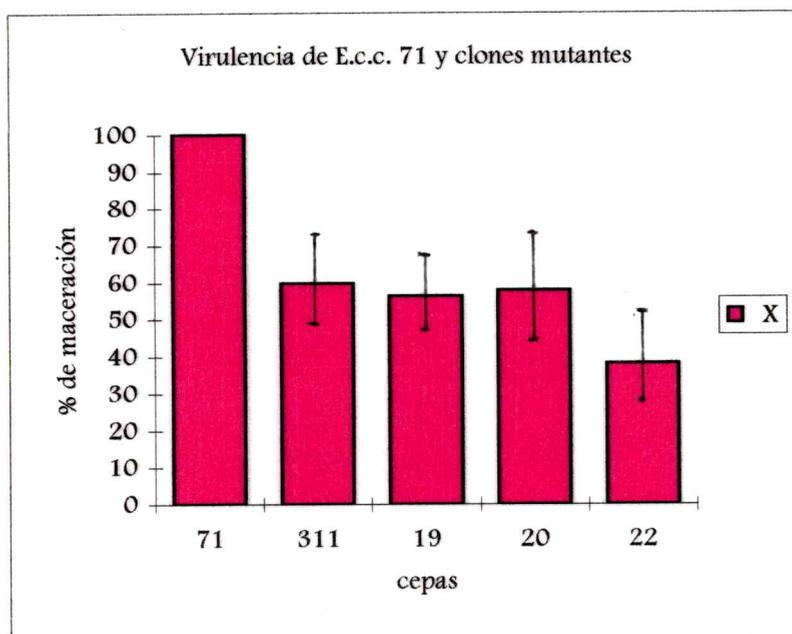


Figura 26. Porcentajes de maceración de tubérculos de papas exhibidos por los clones mutantes $OmpE^{(-)}$ de *Ecc* 71, comparados con la maceración producida por la cepa parental *Ecc* 71, a la que se le ha asignado un valor de 100%. El trazo indica el error estándar.

La figura 26 corresponde al gráfico de barras de los porcentajes promedios de maceración de las cepas mutantes carentes de OmpE, comparados con el 100%, valor asignado a la maceración producida por *Ecc* 71. Se puede apreciar que todas las mutantes que carecen de la porina OmpE han disminuído su virulencia, con respecto a la exhibida por la cepa parental. Mientras que para las mutantes 311, 19 y 20 esta disminución es cercana al 40%, en el caso de la mutante 22 llega a ser del 60%. No se encontró una explicación razonable para tal diferencia entre las mutantes, ya que la mutante 22 no presenta diferencias en ninguno de los aspectos estudiados, con respecto a las otras tres mutantes.

3. Intento de recuperación del fenotipo virulento de los clones mutantes OmpE⁽⁷⁾ de *Ecc* 71.

Considerando que *Ecc* 71 carente de la porina OmpE, mostró una disminución en la capacidad de macerar el parénquima del tubérculo de papa, se realizaron algunos ensayos tendientes a recuperar la porina propia de la bacteria, o sino producir la complementación por introducción de la información genética de una porina relacionada y probar que la bacteria recuperaba así su virulencia.

3.1 Uso de recombinación homóloga mediante en fago P22.

Ya que la estrategia de transducir marcas genéticas a *Erwinia* mediante el fago P22 había tenido éxito anteriormente, se intentó realizar transducción de marcas desde una cepa de *S. typhimurium* silvestre a las mutantes de membrana externa, tet^R de *Ecc* 71, con el fin de aislar bacterias transductantes que hubiesen perdido la resistencia a tetraciclina, por recombinación entre la región *ompC* de *S. typhimurium* llevando el inserto de Tn10 existente en la región de *ompE*

de *Ecc* 71, y la región *ompC* de *S. typhimurium* MS1 silvestre. Las bacterias que adquieren sensibilidad a tetraciclina dentro de una población de bacterias resistentes, pueden ser seleccionadas cultivándolas en el medio de Bochner-Maloy (Maloy y Nunn, 1981). Este medio de cultivo, según consta en la sección 2.11 de Materiales y Métodos, contiene entre otros, clortetraciclina inactivada por esterilización en autoclave, y ácido fusárico. Las bacterias tet^R desarrolladas en este medio, son inducidas a producir la proteína de resistencia a tetraciclina, la cual se ubica en la membrana citoplásmica, y que es responsable al parecer del ingreso de ácido fusárico al interior de la bacteria. Las bacterias tet^R son eliminadas, y las bacterias tetraciclina sensibles sobreviven, por carecer de la bomba de expulsión de tetraciclina hacia el medio externo.

Se realizaron 5 transducciones con lisados P22 obtenidos desde *S. typhimurium* MS1 con cada una de los 4 clones mutantes de *Ecc* 71. En los análisis realizados mediante PAGE-SDS o en PAGE-SDS-urea, de los extractos de ME de los clones tetraciclina sensible desarrollados en el medio Bochner-Maloy, nunca se encontró alguno que expresara OmpC de *S. typhimurium*.

3.2 Complementación del fenotipo OmpE⁽⁻⁾ de *Ecc* mediante el plásmido pSTP2B1.

El plásmido pSTP2B1 contiene un fragmento de DNA de 3.100 pb conteniendo el gen completo *ompC* de *S. typhi* inserto en el sitio *Bam*HI de pUC19. Este plásmido fue construido por I. Zaror (1989 a) por digestión con la enzima de restricción *Bgl* II, del cosmidio pH79 en el cual había sido clonado un fragmento de 30-35 kb, del cromosoma de *S. typhi* conteniendo el gen *ompC*. Los fragmentos resultantes fueron subclonados en pUC19 y utilizados para transformar *E. coli* DH5 α de

donde se seleccionó aquel clon que producía la proteína OmpC de *S. typhi*, y cuyo plásmido pSTP2B1 fue usado para transformar la cepa de *E. coli* JM 109.

Desde esta última cepa, se aisló pSTP2B1 y luego, según la técnica señalada en la sección 2.8.3 de Materiales y Métodos, fue purificado mediante electroelución desde un trozo de agarosa de una electroforesis preparativa, que contenía la banda de DNA del plásmido. La figura 27 A muestra en los carriles 1 y 3 el plásmido pSTP2B1 purificado, con un tamaño molecular de 5886 pb calculado por Zaror, 1989a.

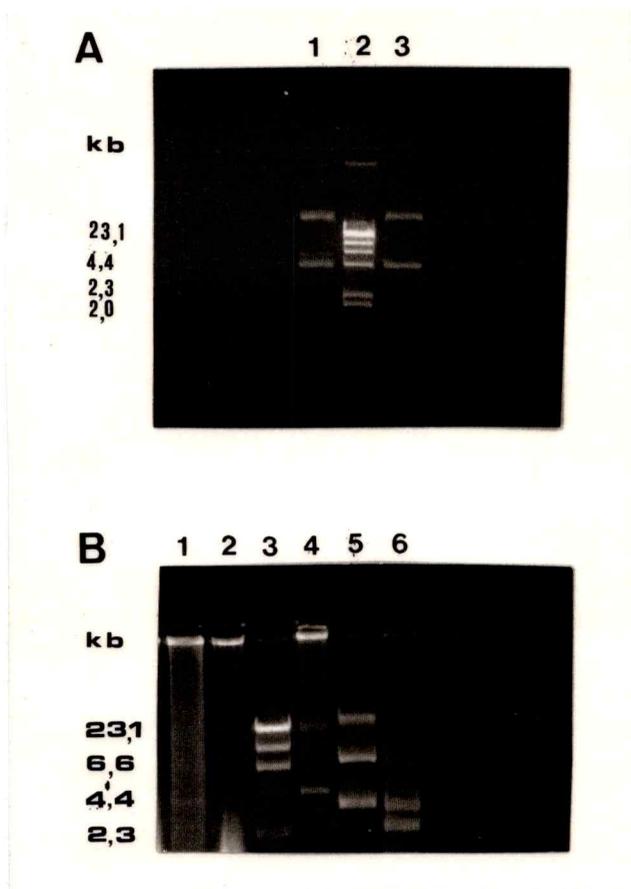


Figura 27. Electroforesis del DNA sobreenrollado del plásmido pSTP2B1 en agarosa al 0,7 % (A), y de DNA obtenido de clones transformados con pSTP2B1 (B). En el costado izquierdo se encuentran indicados los tamaños moleculares en kb.

(A) Carriles 1 y 3, contienen DNA del plásmido pSTP2B1 de la cepa de *E. coli* JM 109; carril 2, contiene DNA de λ -Hind III, como estándar de tamaños moleculares.

(B) Carril 1, *Ecc* 71; carril 2, clon 20(8); carril 3, DNA de λ -Hind III; carril 4, clon 71(2); carril 5, *E. coli* JM 109 (pSTP2B1); carril 6, clon 311(5).

Ya que los clones producto de esta transformación, serían seleccionados por su resistencia a ampicilina, se determinó la concentración a la cual podrían ser seleccionados, ya que *Ecc* 71 poseía una resistencia al antibiótico > 200 µg/ml.

Se sembraron *Ecc* 71 y los clones mutantes 311, 19, 20 y 22 en placas de AL conteniendo 0, 100, 200, 400 y 500 µg de ampicilina/ml. Después de 24 hrs de incubación todos los cultivos presentaron desarrollo. Se repitió el experimento, usando el Medio Mínimo A1 hasta la concentración de 600 µg/ml; todos los cultivos fueron inhibidos a 400 µg de ampicilina/ml, por lo que se realizó la selección de transformantes en placas de A1 conteniendo 600 µg del antibiótico/ml.

La transformación de las bacterias con el plásmido pSTP2B1 se realizó con células competentes y según la técnica del CaCl₂ descrita en la sección 2.7 de Materiales y Métodos. Las transformaciones usando los clones mutantes 311, 19, 20, 22 y también la cepa parental *Ecc* 71 como control, fueron realizadas en dos ocasiones. Toda la mezcla de transformación para cada cepa, fue sembrada en dos placas conteniendo el medio de cultivo señalado en el párrafo anterior. En total, se obtuvieron 4 clones resistentes a ampicilina de la cepa parental *Ecc* 71; 8 del clon mutante 19; 7 del clon mutante 20; 2 del clon mutante 22 y 5 del clon mutante 311, todos los cuales fueron denominados con el número de su cepa seguido de un número entre paréntesis (71(1), 71(2) etc.) Después de subcultivar estos clones en medio líquido A1 con 600 µg de ampicilina/ml mantuvieron su condición de resistentes los clones 71(1) y 71(2) de *Ecc* 71; los clones 19(1), 19(2), 19(3), 19(4), 19(5), 19(7) y 19(8) de la mutante 19; los clones 20(5) y 20(8) de la mutante 20; ninguno de la mutante 22; y 311(5) de la mutante 311.

3.2.1 Aislamiento e identificación de pSTP2B1 en los clones resistentes a ampicilina.

Se analizó la presencia de plásmidos, mediante electroforesis en agarosa 0,7% , de todos los clones resistentes a ampicilina señalados antes. En la figura 27 B se presenta el resultado de la extracción de DNA plasmidial de 3 de los clones resistentes (carriles 2, 4 y 6) y de *Ecc* 71, comparados con el DNA del plásmido pSTP2B1 en el carril 5. En los carriles 2 y 4 no se observan evidencias de DNA plasmidial como pSTP2B1, en las muestras de los clones 20(8) y 71(2) respectivamente. En el carril 6, cuya muestra de DNA corresponde al clon 311(5), se observan dos bandas, una de las cuales coincide con una de las bandas mostradas por pSTP2B1 del carril 5, resultado que podría indicar que se trata del plásmido en estudio, junto con otra forma del mismo plásmido (banda inferior). Cabe hacer notar que la banda de tamaño superior a 4,4 kb del clon 71(2) en el carril 4, podría corresponder a un plásmido críptico, de un número muy bajo de copias, ya que fué una banda que se visualizó en forma esporádica en las preparaciones realizadas con el objeto de aislar plásmidos en las cepas derivadas de *Ecc* 71.

Para verificar la identidad del plásmido del clon 311(5), se analizó su patrón de restricción con la enzima *EcoRI* para la cual existe un sólo sitio de corte (figura 28). Se observa en el carril 4 el DNA de pSTP2B1 y en el carril 5 la digestión de éste con *EcoRI* y formación de una banda de tamaño molecular superior a 4,4 kb.. Los resultados obtenidos con la digestión del DNA extraído desde el clon 311(5) no fueron claros (carril 7 sin digestión, y carril 6 digerido con *EcoRI*), ya que se presentan muchas bandas en la muestra sin digerir , y luego de la digestión aparece tenuemente una banda adicional correspondiente al tamaño molecular de 6.0 kb a la misma altura en que aparece la banda del plásmido pSTP2B1 digerido.

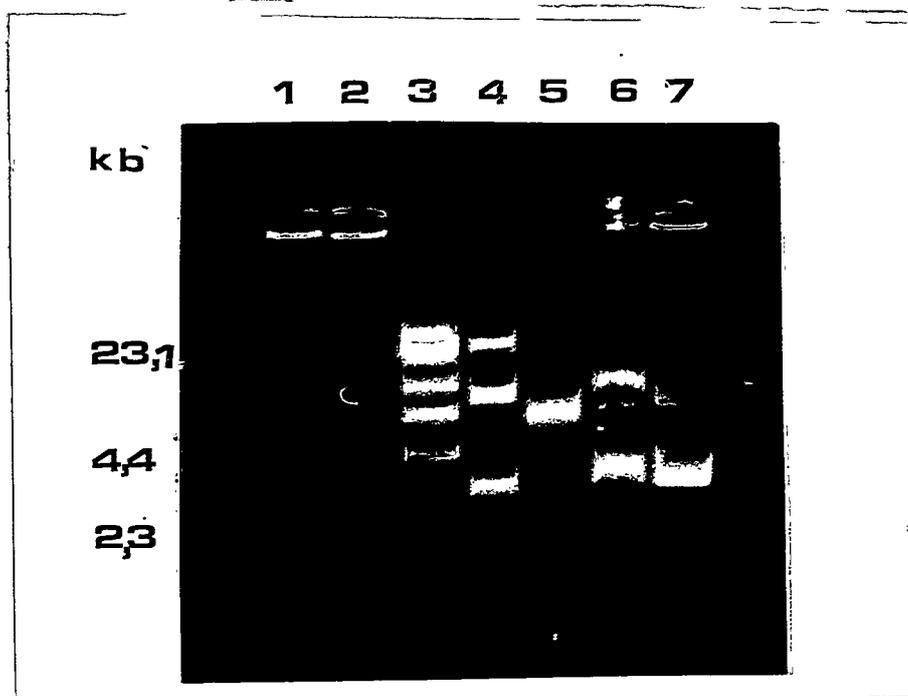


Figura 28. Electroforesis del DNA plasmidial pSTP2B1 y del DNA plasmidial extraído desde el clon 311(5) de *Ecc* 71, en gel de agarosa al 0,7 %. Análisis de la digestión de pSTP2B1 y DNA plasmidial del clon 311(5) mediante la enzima de restricción *EcoRI*.

Al costado izquierdo se señalan los tamaños moleculares en kb.

Carril 1, DNA plasmidial de *Ecc* 71; carril 2, DNA plasmidial del clon mutante 311; carril 3, DNA de λ -*Hind* III; carril 4, plásmido pSTP2B1; carril 5, plásmido pSTP2B1 digerido con *EcoRI*; carril 6, DNA plasmidial del clon 311(5) digerido con *EcoRI*; carril 7, DNA plasmidial del clon 311(5).

3.2.2 Caracterización de la proteína expresada por el clon 311(5)(pSTP2B1).

El estudio del perfil de proteínas de ME de los clones aislados, resistentes a ampicilina, indicó que ninguno expresaba la proteína OmpC de *S. typhi* salvo el caso del clon 311(5).

Como se puede apreciar en el electroforetograma de la figura 29 A, correspondiente a PAGE-SDS-urea, en cuyo costado izquierdo están señaladas las posiciones de OmpE y OmpA de *Ecc* 71 y en el derecho se encuentra la posición de

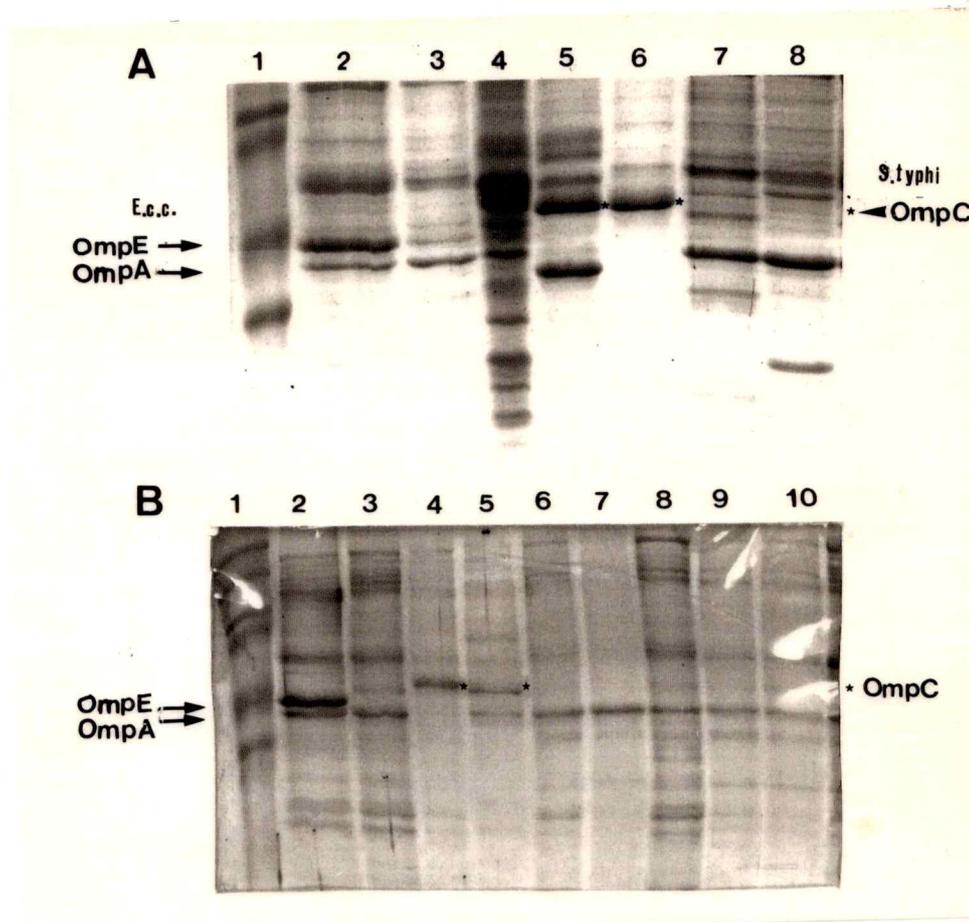


Figura 29. Electroforetograma de proteínas de ME, en PAGE-SDS-urea, al 12,5%. Las flechas al costado izquierdo indican la posición de OmpE y OmpA de *Ecc* 71, y el * indica la posición de OmpC de *S. typhi* al costado derecho. Se muestra sólo la zona relevante de los geles.

(A) Carril 1, estándares de masas moleculares preteñidos; carril 2, *Ecc* 71; carril 3, *Ecc* 71(2) derivado de *Ecc* 71; carril 4, *S. typhi* Ty2; carril 5, *E. coli* JM 109 (pSTP2B1); carril 6, clon 311(5) (pSTP2B1) derivado del clon 311; carril 7, clon mutante 311 OmpE (-); carril 8, clon mutante 19 OmpE (-).

(B) Carril 1, estándares de masas moleculares preteñidos; carril 2, *Ecc* 71; carril 3, clon mutante 311 OmpE (-); carril 4, clon 311(5) (pSTP2B1) derivado del clon 311; carril 5, *S. typhimurium* MS1; carril 6, clon 311(51-2) derivado del clon 311(51); carril 7, clon 311(51-3) derivado del clon 311(51); carril 8, clon 311(51) producto de la "curación" del clon 311(5); carril 9, clon 22(01) derivado del clon 20; carril 10, clon 22(02) derivado del clon 22..

OmpC de *S. typhi*; el clon 311(5) (carril 6) expresa una proteína no existente en el patrón de *Ecc 71* (carril 2) ni en el del clon mutante 311 su cepa parental (carril 7). Esta proteína posee una migración similar a aquella de *E.coli* JM 109 (pSTP2B1) (carril 5) que corresponde a OmpC de *S. typhi*, la cual no existe en el clon mutante parental, el 311. En el carril 4, se encuentra el perfil de proteínas de ME de *S. typhimurium* MS1 que muestra la proteína OmpC en la misma posición. En el carril 3 se encuentra el extracto de ME del clon 71(2), el que no expresa OmpC de *S. typhi* a pesar de haber sido aislado como ampicilina resistente. En el carril 8 se encuentra el extracto de ME del clon mutante 19, carente de la proteína OmpE.

El clon 311(5) muestra la expresión de la porina OmpC de *S. typhi*, pero con una fuerte represión de OmpA. Para verificar si este efecto era producto de la presencia del plásmido, se llevó a cabo la "curación" del clon 311(5). Para ello se utilizó el procedimiento descrito por He y col. (1991), en el cual las bacterias son cultivadas en el Medio Basal A-P (Torriani, 1960), un medio de cultivo cuyo bajo contenido en fosfatos provoca la desestabilización de los plásmidos y la "curación" de la bacteria. Los resultados de este ensayo se encuentran en el perfil de proteínas de ME de la figura 29 B. La cepa parental *Ecc 71* se encuentra en el carril 2 y el clon mutante 311 en el carril 3. El clon 311(5) (pSTP2B1) en el carril 4, muestra la proteína OmpC de *S. typhi* la que posee una migración semejante a OmpC de *S. typhimurium* MS1 ubicada en el carril 5. Sin embargo, el clon 311(5) "curado" denominado 311(51), en el carril 8, ha perdido la proteína OmpC de *S. typhi* y ha retornado la expresión de OmpA a los niveles previos, así como el de otras proteínas de su ME, comparándola con el clon mutante 311 del carril 3. Por otra parte, 311(51) ha perdido la resistencia a ampicilina conferida por el plásmido pSTP2B1.

Al igual que como se había intentado la recuperación de la porina ausente en los clones mutantes 311, 19, 20 y 22 mediante transducción del gen *ompC* de *S. typhimurium* MS1 con lisados del fago P22, se hizo el mismo ensayo con el clon 311(51). Los carriles 6 y 7, de la figura 29 B contienen los extractos de proteínas de ME de clones aislados de los ensayos de transducción de fago P22 con el clon 311(51), estos clones fueron denominados 311(51-2) y 311(51-3); mientras los carriles 9 y 10, contienen los de las transducciones realizadas con el clon mutante 22. En ninguno de estos casos se obtuvo un clon que expresara una proteína de migración semejante a OmpC de *S. typhimurium*.

Se estudió la reactividad de la proteína expresada por el clon 311(5) ante el suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*. Los resultados se muestran en la figura 30 en la cual (A) corresponde a los perfiles de proteínas de ME, después de ser separadas en PAGE-SDS-urea; y (B) corresponde al "Immunoblot" de las proteínas separadas en (A) contra suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*. El carril 4 de la figura 30 B, corresponde al clon 311(5), que presenta una banda de proteínas que reacciona positivamente con el antisuero, y que coincide con aquella de *E. coli* JM 109 (pSTP2B1) (carril 5) lo que confirma que el clon de *Ecc* está expresando la porina de *S. typhi*. Ante la ausencia de OmpA en el perfil de proteínas del clon 311(5), y ante la posibilidad que la sobre-expresión de OmpC de *S. typhi* en este clon, estuviera impidiendo la normal localización de OmpA en la ME y por lo tanto permaneciera en una localización intracitoplásmica o periplásmica, se separaron las proteínas del extracto completo de este clon, carril 8. Se comprueba en el "Immunoblot", que no hay presencia de una proteína que corresponda con la migración de OmpA en esta bacteria, lo que estaría confirmando que se ha producido una represión en la expresión de esta proteína. En esta misma figura, se muestra el

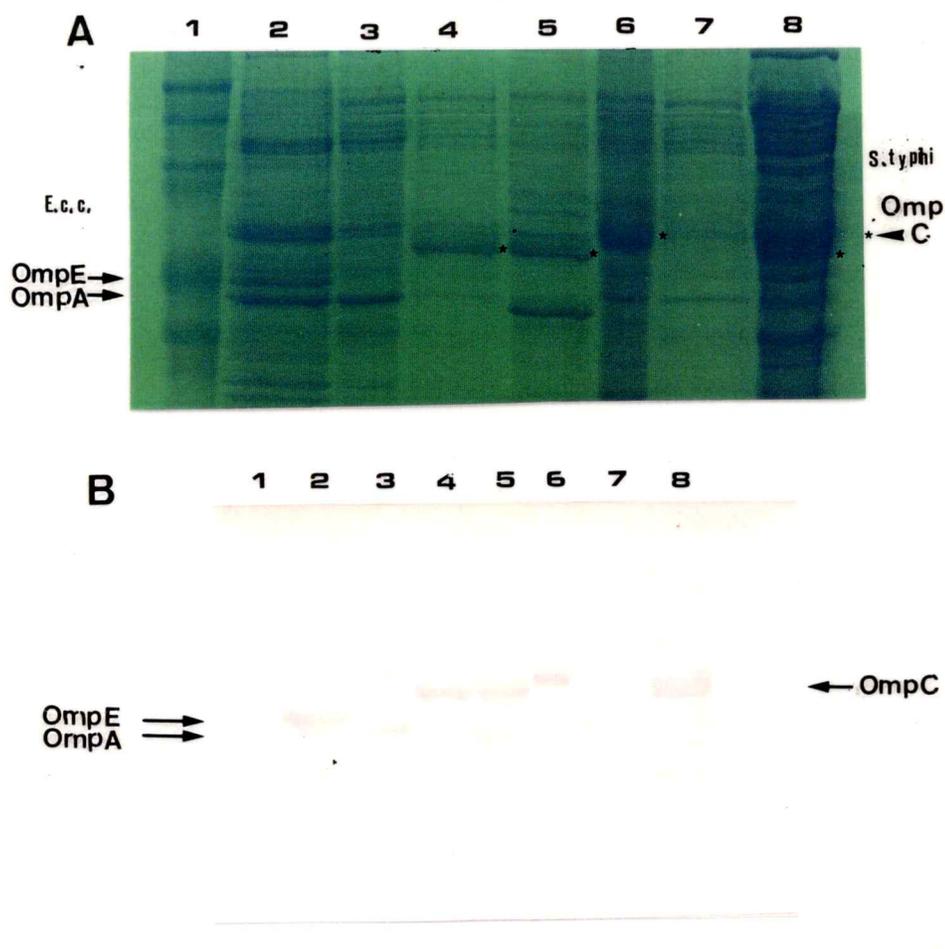


Figura 30. Electroforetograma de proteínas de ME obtenido por PAGE-SDS-urea. Análisis de la expresión de la proteína OmpC de *S. typhi* por el clon 311(5) y 311(51), y el "immunoblot" frente a suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*. En el costado izquierdo se indica la posición de OmpE y OmpA de *Ecc* 71, y en el costado derecho la posición de OmpC de *S. typhi*.

(A) Separación de proteínas de ME en PAGE-SDS-urea al 12,5%.

Carril 1, estándares de masas moleculares ; carril 2, *Ecc* 71; carril 3, clon mutante 311 OmpE(-); carril 4, clon mutante 311(5) OmpE(-) (pSTP2B1); carril 5, *E. coli* JM109 (pSTP2B1); carril 6, *S. typhi*; carril 7, clon 311(51) obtenido por "curación" del clon 311(5) ; carril 8, lisado total de bacterias del clon 311(5).

(B) "Immunoblot " realizado usando suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium*.

Los carriles contienen idénticas muestras que la figura (A).

perfil de proteínas e inmunorreactividad del clon 311(51) (carril 7), en el que se confirma la pérdida de expresión de OmpC de *S. typhi* y por lo tanto su "curación", además de presentar un leve aumento en la expresión de OmpA.

3.2.3 Virulencia del clon transformante 311(5) que contiene el plásmido pSTP2B1.

Para determinar la virulencia del clon 311(5) se utilizó el ensayo de maceración de tubérculos de papas, por inoculación de la suspensión de bacterias en orificios abiertos en la superficie de éstas, según se ha descrito en la sección 2.3.2 de Materiales y Métodos.

Se realizaron 27 inoculaciones, de las cuales se recogió el tejido macerado y se calculó el porcentaje de maceración, tomando como 100% de actividad el macerado producido por la cepa nativa *Ecc 71*, inoculado como control en cada uno de los tubérculos. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 15, en donde se han agregado a modo de comparación, los datos que corresponden a la maceración producida por su cepa parental 311 OmpE(-), en tubérculos de papas.

Los resultados, graficados en la figura 31, indican que el clon transformado 311(5) OmpE(-) OmpC(+), ha disminuído su virulencia en 34,2 % en relación a su cepa parental el clon mutante 311 OmpE(-) si se toman en cuenta las medias estadísticas; y que con respecto a la cepa parental *Ecc 71*, sólo llega a 1/3 de la virulencia mostrada por ésta. Se podría inferir, que la introducción del plásmido pSTP2B1 que contiene el gen *ompC* de *S. typhi* no ha producido la complementación necesaria en el clon 311 OmpE(-), y la recuperación de su virulencia. Esta falla en la complementación, podría ser debida en parte, a la inestabilidad del plásmido, una vez que las bacterias son inoculadas en el tubérculo de papa y eliminada la presión selectiva por ausencia del antibiótico.

Tabla 15.-

Comparación entre la virulencia de *Ecc* 71 y clones mutantes.

	71	311	311(5)
N	(50)	(35)	(27)
MEDIA	100	59,8	25,6
ERROR	0	$\pm 12,6$	$\pm 8,84$

N = N° de casos

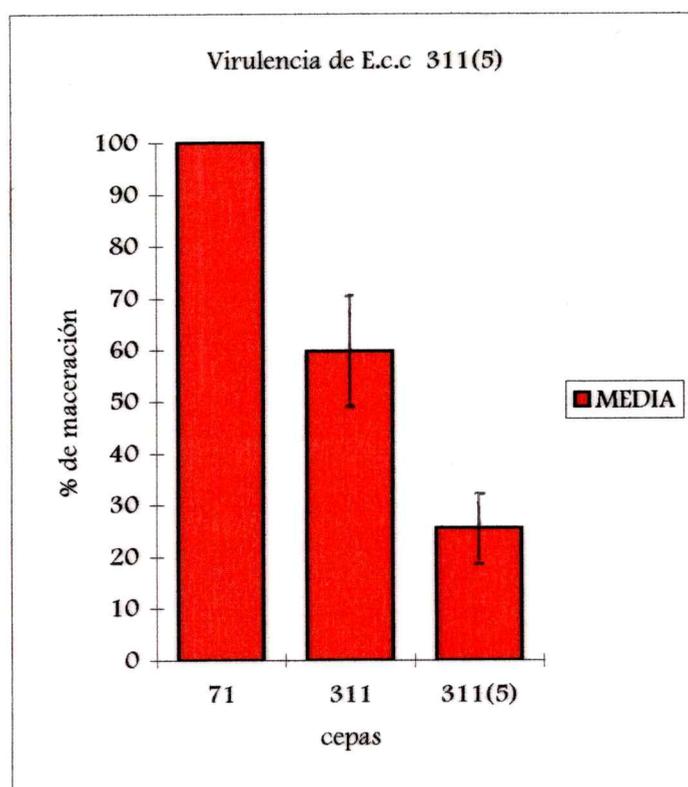


Figura 31. Porcentajes de maceración exhibidos por las mutantes 311 OmpE (-) y 311(5) OmpE (-) /OmpC (+) de *S. typhi*, inoculadas en tubérculos de papas. El trazo indica el error estándar.

Así, se hizo necesario establecer la estabilidad del plásmido en el clon 311(5) [OmpE(-)/OmpC (+)(pSTP2B1)]. Se siguió la técnica descrita en la sección 2.8.9 de Materiales y Métodos.

Se realizaron 3 experimentos con 3 grupos de 5 tubérculos cada uno, en los que se hicieron: dos inoculaciones del clon 311(5); una de la cepa *Ecc* 71 y una del clon 311 OmpE(-), en cada tubérculo. Según el cálculo de células viables para el clon 311(5), se inocularon $2,2 \times 10^8$ bacterias en un volumen de 10 μ l por perforación. La cosecha de los macerados se hizo a las 24 , 48 y 72 hrs de incubación. Los macerados producidos por el clon 311(5) se resuspendieron en 1 ml de medio A1 sin glucosa, se hicieron las diluciones necesarias, y se sembraron en placas de CVP suplementadas con 500 μ g de ampicilina/ml y en duplicados sin antibiótico, las que fueron utilizadas para hacer el recuento de bacterias viables.

La Tabla 16 muestra la cantidad de bacterias que son capaces de mantener la resistencia al antibiótico en relación al total de bacterias recuperadas de las zonas de maceración.

Tabla 16.

Estabilidad del plasmidio pSTP2B1
en el clon 311(5) de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Incubación de papas inoculadas (hrs).	Concentración de bacterias totales. (CVP)	Concentración de bacterias CVP-Ampicil.	Razón Resist./ Totales
24	$5,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	0,0370
	$1,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^7$	0,0180
	$6,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	0,0400
48	$2,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^6$	0,0015
	$5,2 \times 10^9$	$3,4 \times 10^7$	0,0065
	$6,5 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^8$	0,0061
72	$1,7 \times 10^8$	$9,5 \times 10^5$	0,0055
	$3,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^5$	0,0020
	$3,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^5$	0,0020

Una razón cercana a 1 entre las bacterias que son capaces de crecer en CVP suplementada con 500 µg de ampicilina, y las bacterias que se desarrollan sin antibiótico sería indicadora que el plasmidio es estable dentro de las bacterias. De los resultados obtenidos, se puede deducir, que las bacterias sensibles van aumentando en número a medida que transcurre el tiempo de infección, lo cual quiere decir también que van perdiendo la información genética de *ompC* aportada por el plasmidio. La inestabilidad del plasmidio no permite conocer si la recuperación de la porina devolvería la virulencia a esta bacteria.

3.3 Intercambio de marcas genéticas.

El ensayo de "intercambio de marcas genéticas" se basa en el hecho que una bacteria conteniendo un gen mutado, puede volver a su fenotipo original, por recombinación de éste gen con un gen homólogo contenido en un plásmido (Torriani, 1960; Roeder y Collmer, 1985; Lindeberg y Collmer, 1991).

Los ensayos consistieron en sembrar el clon 311(5) conteniendo el plásmido pSTP2B1, en el medio de cultivo A-P de bajo contenido en fosfatos suplementado con ampicilina (Torriani, 1960), descrito en la sección 2.8.7 de Materiales y Métodos, para permitir el intercambio de marcas. Se realizó este ensayo 10 veces y a los clones resultantes se les estudió el perfil de proteínas de ME, verificándose que ninguno de los clones obtenidos expresaba la proteína OmpC de *S. typhi*, cuyo gen estaba contenido en el plasmidio con el que había sido transformada la mutante 311 y por lo tanto, no había tenido éxito el intento de devolver a esta mutante una proteína de ME.

DISCUSIÓN

La membrana externa (ME) de las bacterias Gram negativas, es una estructura altamente especializada, que constituye una barrera física y funcional entre la bacteria y el medio circundante.

La principal función asignada a esta membrana, hasta hace unos años, fue la de servir como barrera a agentes tóxicos tales como antibióticos y detergentes, función correlacionada con las propiedades de permeabilidad de la membrana. Sin embargo, esta membrana también es tremendamente importante en el paso de los nutrientes al interior de la bacteria, como también en funciones de secreción de proteínas (Wandersman, 1992). Las evidencias han llevado a la conclusión que proteínas como OmpC, OmpF, y OmpD en el caso de *S. typhimurium*, permiten la difusión de un amplio espectro de solutos de pesos moleculares bajo 600 daltons, a través de sus poros hidrofílicos (Nikaido, 1992 y 1994); mientras que, en el caso de *Pseudomonas* el límite de exclusión de las porinas se ha calculado entre 3000 a 9000 daltons (Hancock y Nikaido, 1978; Bellido y cols., 1992).

Estas proteínas confieren permeabilidad a azúcares como monosacáridos y disacáridos, a aminoácidos, presumiblemente di y tripéptidos, iones inorgánicos, β -lactanos, nucleótidos, cloranfenicol (Osborn y Wu, 1980).

El género *Erwinia* constituye uno de los grupos más importantes de bacterias Gram-negativas fitopatógenas, cuyos estudios sobre patogenicidad y virulencia se han centrado principalmente en la capacidad de producción de enzimas extracelulares que degradan la pared celular de la célula vegetal, tales como, pectinasas, celulasas y proteasas (Kotoujansky, 1987; Hugovieux-Cotte-Pattat y cols., 1986; Perombelon y Kelman, 1980).

La participación de la ME en los procesos de patogenicidad y virulencia en estas bacterias, ha sido abordada por Expert y Toussaint (1985); e Ishimaru y Loper (1992); quienes han tratado de determinar cuáles serían los componentes de esta estructura que estarían involucrados en estos fenómenos. El primer grupo, determinó, aislando mutantes espontáneas de resistencia a 9 bacteriocinas producidas por cepas de *Erwinia chrysanthemi*, y siendo estas mutantes normales para la producción de enzimas pectinolíticas o celulolíticas, que la pérdida de patogenicidad se correlacionaba con la carencia de al menos una de tres proteínas de ME, inducibles a bajas concentraciones de hierro y con una movilidad electroforética que las ubica entre los rangos de 80 - 90 kDa de masa molecular. El segundo grupo ha estudiado, el sistema de adquisición de hierro de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y la presencia de un receptor de hierro tipo aerobactina de 80 kDa ubicado en la ME.

Otra línea de estudio, ha involucrado a *Erwinias* deficientes en la exportación de pectinasas y celulasas, (Andro y cols., 1984; Thurn y Chatterjee, 1985; Ji y cols., 1987 y 1989; Guzzo y cols., 1990; He y cols., 1991). Las bacterias mutantes, presentan deficiencia coordinada en la exportación de estas enzimas, las cuales son acumuladas en el periplasma. Estas mutantes *out*, son bacterias incapaces de traslocar las enzimas a través de la ME hacia el medio circundante. El sistema de secreción, de *Erwinia chrysanthemi*, se ha encontrado similar al que exhibe *Klebsiella* en la secreción de pululanasa, la que para atravesar la membrana externa requiere de proteínas codificadas al menos por 14 genes.

Por ser la ME la estructura que relaciona al microorganismo patógeno con su hospedero, es que nos interesó la idea de estudiar la relación que pudiera existir entre las proteínas constituyentes de esta estructura y la virulencia de

la bacteria, más aún, sabiendo que la expresión de proteínas de la ME es regulada por factores del medio ambiente y que la producción de pudrición blanda es gatillada por cambios en las condiciones ambientales de los tubérculos en almacenamiento.

Los microorganismos poseen la información genética necesaria para tener la potencialidad de responder a cambios de su microambiente. La amplia variedad de respuestas fenotípicas encontradas dentro de ciertos microorganismos, demuestran claramente que ninguna de las especies microbianas estudiadas expresa por completo su genoma, bajo ningún conjunto de condiciones ambientales. Ellos sólo expresan aquella parte del genoma que los capacita para estar estructural y funcionalmente adaptados a un cierto conjunto de condiciones ambientales. Es así como no tiene sentido hablar de una cierta composición química de un microorganismo, sin que al mismo tiempo se especifique en qué condiciones ambientales había sido desarrollado (Harder y Dijkhuizen, 1983).

Se ha determinado que en muchas bacterias, las señales del medio ambiente, controlan la expresión de determinantes de virulencia. Se ha demostrado que en *Pseudomonas aeruginosa*, la expresión de la exotoxina A (Storey y cols., 1990), y en *Vibrio cholerae* (Goldberg y cols., 1990) la expresión de la proteína de membrana externa IgrA, asociada a virulencia, se encuentran controladas por las concentraciones de hierro presentes en el medio. Por otra parte, se ha comprobado que los microorganismos pueden sufrir modificación en la expresión de sus determinantes de virulencia, cuando enfrentan cambios en las condiciones de temperatura de su entorno. En *Shigella flexneri* la capacidad invasiva es regulada por el locus *virR* el cual es afectado por la temperatura (Hale, 1991); en especies de *Yersinia* los plásmidos que contienen los genes de virulencia *vir* (Mulder y cols., 1989), *Icr* (Barve

y Straley, 1990), o *yop* (Bergman y cols., 1991) son expresados sólo a 37°C en ausencia de Ca^{2+} .

La osmolaridad controla la virulencia de varios organismos, como por ejemplo, en *Vibrio cholerae* la expresión de la toxina del cólera (Miller y Mekalanos, 1988); en *Salmonella typhimurium* la expresión de OmpF y OmpC (Chatfield y cols., 1991), y su virulencia (Dorman y cols., 1989); en *Shigella flexneri* la expresión de *envZ*, el cual a su vez controla la expresión de OmpC y OmpF (Bernardini y cols., 1990 y 1993).

La anaerobiosis es otra señal ambiental importante para algunos microorganismos. Induce el fenotipo invasivo en *S. typhimurium* (Ernst y cols., 1990; Lee y Falkow, 1990; Schiemann y Shope, 1991) y el aumento de CO_2 en las células eucarióticas induce la producción de enterotoxina de *Vibrio cholerae* (Shimamura, 1985).

Erwinia carotovora es un modelo interesante para el estudio de patogenicidad y virulencia, por el hecho que es una bacteria Gram-negativa que desencadena un estado infeccioso en plantas, el que lleva a la maceración del tejido vegetal.

1.- Proteínas de ME de *Ecc 71* reguladas por condiciones del medio .

El perfil de proteínas de ME, analizado tanto en PAGE-SDS como en PAGE-SDS-8M urea, muestra que *Ecc 71* posee 2 proteínas mayores, en la zona de migración que corresponde a estas proteínas en *Enterobacteriaceae*. En los trabajos realizados por Hofstra y Dankert (1980) con una gran variedad de miembros de esta familia, se determinó que todos ellos poseían de 2 a 4 proteínas principales

entre los rangos de masa molecular de 30 a 50 kDa, unas asociadas a peptidoglican y otras no asociadas a éste denominadas "proteínas modificables por calor".

El patrón electroforético de *Ecc* 71 muestra dos proteínas principales, una de 40 kDa y otra de 37,9 kDa. El perfil de proteínas de *Ecc* 71 es claramente distinguible del de *E. coli* y *S. typhimurium* por la posición general de las bandas de proteínas y por la diferente posición que muestran las porinas de estas dos cepas con respecto a la migración de las dos proteínas principales de *Ecc* 71. Los electroforetogramas de las muestras de proteínas de ME sin calentar a 100°C muestran la ausencia de estas bandas, coincidente con la ausencia de las porinas de *E. coli* y *S. typhimurium*, hecho que estaría indicando que estas proteínas forman agregados, los cuales al no ser calentados se mantienen como tales y migran en una posición superior, que podría corresponder a la migración de trímeros, en PAGE-SDS, caso que corresponde a las proteínas asociadas a peptidoglican; y por otro lado, podrían corresponder a proteínas llamadas "modificables por calor" que migran en una posición inferior si la muestra no es calentada, con respecto a la misma muestra calentada a 100°C. (Osborn y Wu, 1980).

Mediante reacciones de "immunoblot", se determinó que la proteína de 37,9 kDa era inmunorreactiva tanto frente a antisuero contra OmpC de *S. typhi* como contra un antisuero conteniendo anticuerpos policlonales contra OmpF y contra OmpA de *S. typhimurium*; mientras la proteína de 40 kDa sólo lo hacía con este último antisuero. Ante la duda si la proteína de 37,9 kDa correspondía a OmpC o a OmpF, y basado en los trabajos de Hofstra y Dankert (1980), quienes determinaron que la reacción cruzada de las proteínas principales de ME de *Enterobacteriaceae* contra sus antisueros es un fenómeno general, independiente de cualquier variación de masa molecular de las proteínas de diferentes cepas bacterianas, y mientras no se

tuvieran mayores antecedentes para definir frente a cuál de las dos proteínas nos encontrábamos, se decidió nombrarla como OmpE.

En cuanto a la proteína de 40 kDa, sería equivalente a OmpA considerando su reactividad con el suero conteniendo una mezcla de anticuerpos contra OmpF y contra OmpA de *S. typhimurium*, pero no así con el suero anti OmpC de *S. typhi*.

Cabe hacer notar, que en reacciones de "immunoblot" de PAGE-SDS con muestras sin calentar y utilizando suero anti OmpC de *S. typhi*, no se detectaron bandas, en la zona de 30- 50 kDa de las proteínas de *Ecc 71*, hecho similar al observado en los controles de *E. coli* y *S. typhimurium*. Se determinó así que estas proteínas de *Ecc 71* mostraban un comportamiento similar a las proteínas principales de otras enterobacteriáceas. Sin embargo, cuando el "immunoblot" se realizó con el suero anti-OmpF/OmpA de *S. typhimurium* se pudo visualizar una banda de proteína en *Ecc 71*, migrando en una posición inferior de aquella que ocupaba cuando la muestra fué calentada previa a la electroforesis, hecho similar al ocurrido con las muestras controles de *E. coli* y *S. typhimurium* y que nos permitía concluir que se trataba de una proteína equivalente a Omp A.

La separación electroforética de porinas, tanto en *E.coli* como en *S. typhimurium*, es mejorada cuando se realiza en PAGE - SDS - 8M urea. Los electroforetogramas de las proteínas de ME de *Ecc 71* estudiadas en este sistema, mostraron dos bandas de proteínas al igual que en el sistema de electroforesis sin urea, sin embargo al realizar el "immunoblot" con suero anti-OmpC de *S. typhi* se pudo determinar que las posiciones relativas de ambas bandas proteicas había cambiado, Omp E migraba menos que OmpA. Este cambio de migración, es un hecho ya observado en porinas de *S. typhi*, en la que OmpF migra por sobre OmpC cuando el

gel resolutivo de la electroforesis posee baja concentración de sales, fenómeno que es revertido si se agrega NaCl a una concentración final 50 mM (Lobos y Mora, 1991). La diferencia que existiría entre las proteínas de estas dos bacterias, es que mientras OmpC de *S. typhi* migra más que OmpF en PAGE-SDS-NaCl, y migra menos que OmpF en geles en que se omite NaCl, OmpE de *Ecc* 71 migra en la misma posición si el gel resolutivo contiene o no la concentración de NaCl indicada anteriormente, pero cambia su migración si este gel contiene una concentración 8M urea. Estos resultados son coincidentes con aquellos mostrados por Karlsson y cols., 1991, según los cuales *Ecc* presentaría una proteína parecida-a- porina en su ME, aún cuando la estimación de masa molecular no es la misma, posiblemente debido al hecho que las electroforesis realizadas por ellos contiene 4M urea en el gel separador, situación que nosotros hemos probado, altera la movilidad electroforética de dicha proteína, en este trabajo nombrada como Omp E. Por otra parte, mediante análisis de inmunorreacción hemos determinado que la proteína de 40 kDa, a la cual estos autores no hacen referencia a pesar de ser una de las mayoritarias en sus electroforetogramas, correspondería a una proteína homóloga a OmpA, y no así la señalada por ellos con una masa molecular aparente de 25 kDa, con la cual no observamos ninguna reacción frente al antisuero OmpF/OmpA de *S. typhimurium*.

Como se ha discutido anteriormente, las condiciones ambientales juegan un papel en extremo importante en relación a la interacción patógeno-hospedero. Muchas de las señales del medio ambiente controlan la expresión de determinantes de virulencia específicos, como adhesinas, invasinas, toxinas, cápsulas, etc. las que se ha determinado, pertenecen a sistemas regulatorios comunes entre muchas bacterias (Mekalanos, 1992).

En *E. coli* estos sistemas presentan un sensor del cambio en el medio ambiente que transmite la señal, a un segundo componente, el regulador. Estos sistemas corresponden, por ejemplo, a los que detectan cambios de osmolaridad en el medio (*ompR/envZ*), limitación de nitrógeno (*ntrB/ntrC*), limitación de fosfatos (*phoR/phoB*) y presencia de compuestos tóxicos (*cpxA/sfrA*).

Entre las proteínas que relacionan a las *Enterobacteriaceae* con su medio ambiente, y que pertenecen a estos sistemas, se encuentran las porinas. Este es el caso de OmpF y OmpC de *E. coli* de las que se conoce su expresión regulada por condiciones de osmolaridad y temperatura del medio, a través de sistemas regulatorios de dos componentes. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estos genes regulatorios, han revelado un grado de conservación entre los procariontes, a través de la evolución, sistemas que probablemente se han ido adaptando continuamente a diferentes condiciones ambientales (Ronson y cols., 1987).

En el estudio de la expresión de las proteínas principales de ME de *Ecc 71* (OmpE y OmpA) bajo diferentes condiciones de osmolaridad, se comparó el perfil de proteínas de ME. de *Ecc 71*, con el de *E. coli* y *S. typhimurium* bajo condiciones de cultivo de baja osmolaridad (Medio NB, 176 mOsm, Puente y cols., 1991) y de alta osmolaridad (Medio NB-Sacarosa 0,57M). Según los resultados obtenidos, *Ecc 71* muestra una mayor expresión de OmpE que de OmpA cuando es crecida en un medio de baja osmolaridad, mientras que en alta osmolaridad la expresión de OmpE es reprimida en relación a la expresión de OmpA, resultados que estarían de acuerdo con antecedentes de la literatura que indican que las proteínas principales, tanto de *E. coli* como de *S. typhimurium*, se encuentran bajo la regulación del sistema de dos componentes *ompR/envZ*, el que además controla las cantidades relativas de dichas proteínas en respuesta a señales del medio ambiente tal

como la osmolaridad (van Alphen y Lugtenberg, 1977), reprimiéndose la expresión de OmpF en un medio de alta osmolaridad comparada con su expresión en un medio de baja osmolaridad. Más aún, las cantidades de ambas proteínas serían moduladas de tal manera que la cantidad total de ellas en la ME permanecería constante (Wurtzel y cols., 1982, Mizuno y cols., 1982). Por otro lado, las razones OmpE/OmpA obtenidas de las densitometrías de las proteínas de ME de *Ecc 71* de las bacterias crecidas en medio mínimo A1 (3,77) y del mismo medio de cultivo conteniendo 5% NaCl (0,83) están corroborando estos resultados. Así, se podría concluir que según la regulación por osmolaridad, OmpE de *Ecc 71* mostraría un comportamiento funcional más cercano a OmpF de *S. typhimurium* o de *E. coli*.

Con respecto al aumento de la expresión de la proteína de este trabajo denominada OmpA cuando *Ecc 71* es crecida en medio NB-Sacarosa 0,57M, no existirían antecedentes en la literatura que indiquen una posible regulación de esta proteína en otras *Enterobacteriaceae*, frente a los aumentos de osmolaridad del medio. Sin embargo, Karlsson y cols. 1991, reportan la recuperación en cantidad de la proteína 25 kDa, al introducir la información genética *ompRS* de *Ecc* u *ompR/env Z* de *E. coli* a mutantes *Ecc ompR2 :: mini-kan*, sugiriendo que el sistema *ompRS* de *Ecc* podría estar involucrado en la regulación de esta proteína. De la misma manera, se podría pensar que este sistema también tiene bajo control a la proteína de 40 kDa de ME de *Ecc 71* informada en este trabajo.

La expresión de *ompF* en *E. coli* es disminuída por acción del RNA *micF*, cuando las células son expuestas a aumentos de temperatura u otras tensiones (Chou y cols., 1993), al inhibir la traducción del mRNA de *ompF*, y además, participar en la desestabilización del mensaje (Andersen y cols., 1989). La expresión de OmpE y OmpA de *Ecc 71* frente a diferentes temperaturas del medio, fué

determinada calculando las razones OmpE/OmpA obtenidas a partir de densitometrías de los electroforetogramas de proteínas de ME. Estos resultados indicaron que la expresión de OmpE cuando las bacterias se desarrollan a 15°C es la más alta, siempre que el medio de cultivo sea A1 (medio mínimo de sales), mientras que si el medio es Medio Papas o Caldo Luria, la mayor expresión de OmpE se alcanza a 25°C. Esterling y Delihás (1994), analizaron los niveles de RNA de *micF* y *ompF* mRNA producidos por *S. typhimurium*, *Shigella sonnei* y *E. coli* crecidas a 24°C y 42°C de temperatura, lo que reveló un aumento significativo de RNA de *micF* frente al alza de la temperatura, similar al que se conocía en *E. coli* (Mizuno y cols., 1984). Los niveles del RNA *micF* aumentan a medida que disminuye *ompF* mRNA, sin embargo, la magnitud de la respuesta inhibitoria de OmpF frente a un incremento de la temperatura es diferente según la especie. Esto podría estar en concordancia con los resultados obtenidos por nosotros, en el sentido que, si OmpE se comporta fisiológicamente como OmpF de otras enterobacteriaceas, debería ser inhibida a mayor temperatura por efecto del RNA *micF*, aunque no necesariamente debe presentar el mismo control de temperatura que se produce en *E. coli*.

Ante los resultados obtenidos y los antecedentes expuestos anteriormente sobre las adaptaciones que se producen en el patógeno frente a señales presentes en el hospedero, se estudió la influencia que pudiese tener el medio en que se desarrollara la bacteria sobre la expresión de OmpE y OmpA de *Ecc 71*. Para ello se usaron los medios A1, MP, NB, NB-sacarosa 0,57M, CL y tubérculos de papas. Se podría decir que los resultados concuerdan con aquellos obtenidos por acción de la osmolaridad del medio. Las bacterias obtenidas desde la zona de maceración de los tubérculos de papas, presentan en su perfil electroforético casi exclusivamente 4 proteínas de membrana externa, siendo dos de ellas OmpE y OmpA. En estas

condiciones de crecimiento, la expresión de OmpE es menor que la de OmpA, resultado que podría explicarse por el hecho que el tubérculo de papa proporciona un ambiente de mayor osmolaridad para el crecimiento bacteriano, como es el caso del medio A1, por ejemplo. El análisis del electroforetograma mediante "immunoblot" con suero antiOmpC de *S. typhi*, ha indicado que sólo se reconoce una proteína en *Ecc 71* (OmpE), en cualesquiera de los medios de cultivo usados, y que no existe inducción de alguna otra proteína inmunorreactiva a este suero, cuando esta bacteria se ve enfrentada a su hospedero, el tubérculo de papa. La reactividad a este antisuero se explica por la reacción cruzada típica descrita para las porinas de enterobacterias.

En relación a la expresión de OmpE y OmpA de *Ecc 71* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno en el medio, se sabe que uno de los factores que desencadena la pudrición blanda en los tubérculos de papa, es la disminución de la disponibilidad de oxígeno durante su almacenamiento (Maher y Kelman, 1983), por lo cual obviamente, la bacteria se desarrollará en dichas condiciones durante el proceso de maceración. Según los resultados obtenidos, con la bacteria crecida en medio A1, a 3 temperaturas diferentes, y en presencia o ausencia de oxígeno, se advierte que la disponibilidad de oxígeno no es una condición que regule la presencia de estas proteínas en este medio de cultivo, ya que no se encuentra variación en la relación de ellas en las diferentes condiciones mencionadas. Sin embargo, si el análisis se realiza con respecto al desarrollo de la bacteria en diferentes medios de cultivo, se encuentra una regulación de la expresión con disminución de OmpE a medida que aumenta la osmolaridad del medio, llegándose a una disminución importante de esta porina en *Ecc 71* crecidas en CL y en condiciones anaeróbicas. Si se compara este resultado con el obtenido cultivando *Ecc 71* en CL, bajo aerobiosis y a la misma temperatura de 28°C, se observa que la disminución de OmpE es apreciable.

Estos resultados corroboran aquéllos encontrados en condiciones en que la bacteria es crecida en tubérculos de papas, bajo condiciones de carencia de oxígeno, y en el que OmpE disminuye su expresión, hasta hacerse cercana a la de OmpA. Sin embargo, la disminución de OmpE en las bacterias crecidas en CL y anaerobiosis, es mayor que la mostrada por las bacterias desarrolladas en tubérculos de papas, lo cual podría estar indicando que el ambiente interno del tubérculo de papa es menos anaeróbico, que el caso del cultivo *in vitro*, probablemente por la presencia de oxígeno en las células del parénquima del tubérculo, razón por la cual la expresión de OmpE se mantendría en un nivel bajo (razón OmpE/OmpA = 1,22), pero sin llegar a ser menor que la de OmpA .

Para contar con algunos otros antecedentes, acerca de la identificación de estas dos proteínas de ME de *Ecc*, y poder homologarla con alguna de las porinas conocidas de *E. coli* o de *Salmonella* , se intentó evaluar el efecto de sobreexpresión del RNA complementario al mRNA de *ompF*, el RNA *micF*, sobre la expresión de OmpE. Tanto el gen *micF* como su transcrito RNA se han detectado en varias bacterias Gram-negativas, encontrándose que las secuencias nucleotídicas del gen *micF* parecen estar muy conservadas entre ellas (Esterling y Delihás, 1994). Por otro lado, la activación transcripcional del gen *micF* es parte de una respuesta global de regulación en estas bacteria, dependiente de estímulos ambientales, lo que hace que este gen se encuentra bajo el control de varios regulones (Demple, 1991; Li y Demple, 1994). Se realizó la transformación de *Ecc* 71 con el plásmido pSTP2Kmic, que contiene el gen *micF* y sus dos promotores. La presencia del gen *micF* en *Ecc* 71 lleva a una clara disminución de la expresión de OmpE comparada con OmpA cuando las bacterias fueron desarrolladas en medio mínimo de sales A1, y casi a la ausencia de OmpE cuando las bacterias fueron desarrolladas en CL. Si se compara el efecto de la

presencia del plásmido en *Ecc 71*, en las bacterias creciendo a la temperatura de 28°C o de 37°C se puede observar que no existe mayor diferencia, corroborándose los resultados presentados anteriormente con respecto a la temperatura de crecimiento y la regulación de OmpE, en estas bacterias. Los resultados obtenidos con las bacterias transformadas y crecidas en medio mínimo de sales estarían indicando que la regulación ejercida por el gen *micF* en estos ensayos, es mas bien escasa, cuando el medio de cultivo es de baja osmolaridad.

Los ensayos de funcionalidad del gen *micF* de *E. coli* K12 (pSTP2*mic*) realizados en esta misma cepa, mostraron la disminución casi total de porina OmpF. La falta de OmpE en *Ecc 71* por sobreexpresión del gen *micF* de *S. typhi* ha permitido probar por una parte la homología de OmpE con OmpF, y por otra, que puede ser regulada por el gen *micF* con un efecto dependiente de la osmolaridad del medio mas bien que de la temperatura. Esto sería explicable, porque la alta osmolaridad del medio promueve la activación de los promotores de *ompC* y de *micF* contenidos en el plásmido pSTP2K*mic*, activación que sería mediada por el homólogo de *ompR* existente en *E. carotovora*, lo cual ya ha sido sugerido por otros autores (Karlsson y cols., 1991)

2.- Virulencia en mutantes OmpE⁽⁻⁾ de *Ecc 71*.

La mutagénesis de *Ecc 71* se realizó por transducción de marcas desde *S. typhimurium* utilizando el fago P22. Se usaron cepas dadoras de *S. typhimurium* que contenían insertos de Tn10 en genes conocidos (Liu y cols., 1993a), tales como en *ompC*, *ompD*, *gua*, *thr*, *leu*, *tyr*, y *gly*. La utilización del fago P22 como herramienta genética de transducción, en *Erwinia*, es un hecho novedoso, ya que nunca antes se había descrito. Según los resultados obtenidos por el grupo de

trabajo del Dr. G. Mora, el fago P22 puede realizar transducción de marcadores genéticos desde *S. typhimurium* a *S. typhi*, aún cuando es incapaz de formar una progenie en esta última bacteria. Basado en estos hechos, se realizaron los ensayos para transducir diferentes fragmentos cromosómicos con insertos *Tn10*, desde *S. typhimurium* a *Ecc 71* utilizando el fago P22, con el fin de obtener mutantes con alguna alteración en las proteínas de membrana externa. Los clones mutantes obtenidos y resistentes a tetraciclina, fueron aquellos en que se transdujo un fragmento que contenía el inserto de *Tn10* en el gen *ompC* de *S. typhimurium*. Esto estaría indicando que este fragmento encontró una región de nucleótidos, en el cromosoma de *Ecc 71*, con la suficiente homología como para recombinar con ella. De los innumerables intentos de mutagénesis con las cepas auxotróficas, o con la cepa *OmpD*⁽⁻⁾ de *S. typhimurium*, no se obtuvo clones resistentes que mostraran las características fenotípicas requeridas. Curiosamente, nunca fué posible aislar mutantes de *Ecc 71* por transducción a partir de cepas dadoras *ompD::Tn10* de *S. typhimurium*, lo cual estaría indicando la carencia de una región homóloga a *ompD* en *Ecc 71*. Por otra parte, no se disponía de una cepa *OmpF*⁽⁻⁾ (*S. typhimurium ompF::Tn10*) para realizar este mismo ensayo.

El análisis de ME de las mutantes tetraciclina resistentes obtenidas por transducción con la cepa *ompC::Tn10* de *S. typhimurium*, indicó que estas cepas carecían de una de las proteínas principales de ME, correspondiente a la denominado *OmpE*. Ante la posibilidad que la carencia de esta proteína fuese la condicionante que estos clones exhibieran resistencia al antibiótico, se realizó el aislamiento de mutantes espontáneas de *Ecc 71*, a concentraciones de tetraciclina semejantes a las utilizadas en el aislamiento de mutantes *OmpE*⁽⁻⁾, encontrándose que ninguno de los clones de mutantes espontáneas resistentes a tetraciclina mostró la

pérdida de esta proteína. Por otro lado, al realizar el control de transducción de esta misma marca, a una cepa de *S. typhimurium* nativa, se obtuvieron clones mutantes OmpC⁽⁻⁾.

Según Mulholland y cols., (1993), se ha logrado aislar muchas mutantes del género *Erwinia*, producidas por mutagénesis al azar mediada por transposones (Daniels, 1984; Pirhonen y cols., 1991), las cuales han mostrado reducción en su virulencia. Estos factores de virulencia han sido definidos por una parte por Keen (1988), como "factores que ya sea se requieren en la patogenia básica o que aumentan la severidad de la infección"; y por otra, en un sentido más amplio por Mekalanos (1992), como "todos aquellos factores que contribuyen a la infección y a la enfermedad, con excepción de las funciones *housekeeping* que se requieren para la multiplicación eficiente en sustratos no vivos".

Las mutantes de *Erwinia* estudiadas, y que muestran virulencia reducida han sido clasificadas en distintos grupos según su caracterización fenotípica (Handa y cols., 1987; Hinton y cols., 1989; Pirhonen y cols., 1991; Mulholland y cols., 1993). Así, existen mutantes de virulencia reducida que pertenecen a los grupos de: auxotróficas; con alteración en la secreción de distintas enzimas extracelulares; prototróficas, no afectadas en la producción de enzimas extracelulares; alteradas en la velocidad de crecimiento; o que muestran alteraciones en la captación de hierro desde el medio ambiente.

Se realizó el análisis fenotípico de las mutantes obtenidas, con el objeto de determinar si existía algún otro carácter, además de la pérdida de la proteína OmpE, que hubiese sido alterado por efecto de la recombinación homóloga.

Ninguna de las mutantes mostró variación en su fenotipo considerando características metabólicas, prototrofia, resistencia a sales biliares,

morfología colonial o motilidad. Sin embargo, con respecto a la velocidad de crecimiento, las mutantes mostraron un retardo apreciable para entrar a la etapa de crecimiento logarítmico y después de 8 horas de crecimiento en las mismas condiciones que la cepa nativa, la densidad alcanzada por sus cultivos fue prácticamente la mitad de aquella. Estos resultados estarían indicando que las mutantes probablemente están siendo afectadas en su crecimiento, por alteración en su relación con el medio ambiente, probablemente en el ingreso de nutrientes al interior de la células, por carecer de una de las proteínas mayoritarias de su membrana externa, como ha sido sugerido por Nikaido y cols., 1977, en el sentido que mutantes deficientes en porinas muestran disminución en los rangos de difusión de solutos a través de la membrana, con respecto a la bacteria silvestre.

Tomando en consideración los antecedentes que indican que las *Enterobacteriaceae* poseen mecanismos de regulación de las porinas, según las condiciones del medio ambiente, se podrá entender que una mutante de dichas proteínas puede presentar problemas en su crecimiento normal. Las porinas que presentan un poro de mayor tamaño, se encuentran presentes en las primeras etapas de la curva de crecimiento, sin embargo, disminuyen a medida que se introducen en la etapa estacionaria (Pratt y cols., 1996), es posible pensar entonces, que una bacteria que no posee esta proteína, va a estar en inferioridad de condiciones para enfrentar al medio desde un punto de vista nutricional.

Junto a estos resultados se encuentran aquéllos obtenidos en relación a los ensayos de resistencia a antibióticos, en los cuales se ha determinado que la mayoría de las mutantes $OmpE^{-}$ de *Ecc 71* obtenidas, han aumentado su resistencia a antibióticos tales como cefaloridina y cloranfenicol, y que en particular las mutantes 19 y 20 presentan un aumento al doble en su resistencia a ác. nalidixico, resultados

que coinciden con aquéllos que señalan el aislamiento de mutantes de *E. coli* resistentes a cloranfenicol o carbenicilina por ausencia de OmpF, y en otros casos mutantes de *S. typhimurium* resistentes a cefaloridina por ausencia de OmpC u OmpD (Chopra y Eccles, 1978; Jaffe y cols., 1982). Por otra parte, numerosos antecedentes indican que la regulación de proteínas de membrana externa frente a agentes tóxicos estaría dada por regulación mediante *micF*, produciendo la disminución de OmpF, lo cual se traduce en una disminución de las propiedades de permeabilidad de la membrana externa, esto es, la inhibición de la síntesis de aquellas porinas que poseen una mayor eficiencia de difusión (Pratt y cols., 1996). En *E. coli* la presencia de antibióticos o ácidos débiles en el medio, produce aumentos en los niveles de la proteína MarA, proteína que tiene afinidad por unión a DNA y que participa en la regulación de *micF* al unirse al promotor de éste y activar su transcripción (Jair y cols., 1995).

Se examinó la secreción de pectinasas, celulasas y proteasas de las mutantes OmpE⁽⁻⁾, mediante el análisis semicuantitativo en placas, utilizados comúnmente para tal efecto (He y cols., 1991; Teather y Woods, 1982). Los resultados indican que la presencia de pectinasas y celulasas en el medio extracelular ha sufrido una disminución con respecto a la cepa nativa, tanto en crecimiento aeróbico como anaeróbico. Estos resultados no pueden ser explicados por una disminución en la velocidad de crecimiento de estas mutantes, lo que conlleva a una menor masa bacteriana, en circunstancias que se ha observado en la misma cepa nativa, que cuando ésta se desarrolla en anaerobiosis, el crecimiento de la masa bacteriana sobre el medio de cultivo es casi inaparente, sin embargo, el halo producido por la degradación del sustrato es prácticamente igual al del cultivo en aerobiosis, si no es a veces mayor, a aquél en que se ha tenido una masa de bacterias 3 - 4 veces mayor. Por

otra parte, los resultados encontrados en relación a la secreción de proteasas por las mutantes, indican que ésta no ha sufrido alteración relevante, con respecto a aquéllos de la cepa nativa, salvo en el caso de la cepa 311. A pesar de no tener otros resultados acerca de la presencia de pectinasas o celulasas retenidas en compartimentos internos, parecería lógico suponer que existiendo alteración en la constitución de proteínas de ME, pudiese existir anomalías en el proceso normal de exportación de pectinasas y celulasas, las que utilizan el sistema de exportación *out* y que necesitan de la participación de un número importante de proteínas tanto de la membrana interna como de la ME (Wandersman, 1992).

En relación a los resultados obtenidos con la presencia de proteasas extracelulares en las mutantes, en las cuales no se ha encontrado alteración con respecto a su cepa nativa, podría tener sentido tomando en consideración que la exportación de ciertas proteasas no utiliza la vía de exportación *out*, sino que es secretada por un mecanismo que involucra 1 solo paso a través de las envolturas bacterianas independiente del sistema Sec, al estilo de la secreción de hemolisina en *E. coli* (Salmond y Reeves, 1993), y así probablemente el hecho de no contar con OmpE, no sería relevante en la exportación de esta enzima.

Utilizando la técnica de PCR fué posible demostrar, que las mutantes estudiadas, 311, 19, 20 y 22, contenían un inserto Tn10 en sus cromosomas, información genética de la cual carecía la cepa nativa. Se usaron iniciadores que correspondían a secuencias de nucleótidos de los extremos del gen *tetA* de resistencia a tetraciclina y se realizó la digestión de los DNA amplificados obtenidos de las cepas mutantes, con EcoRI y ScaI, obteniéndose fragmentos de DNA de igual tamaño a aquellos producidos por la digestión con las mismas enzimas del amplificado obtenido de la cepa dadora *S. typhimurium* MST 2947, de la cual provino

el fragmento *ompC* :: Tn10. Estos resultados estarían corroborando, por una parte, que es posible la transducción de marcas genéticas desde *S. typhimurium* MST 2947 a *Ecc* 71 mediante el fago P22, y por otra, la recombinación homóloga entre los genes de *ompC* y *ompE* de las respectivas bacterias. Según Riley y Sanderson (1990), y Krawiec y Riley (1990), los mapas de ligamiento de *S. typhimurium* y *E. coli* K12 son extremadamente conservados, lo que se apoya con los hallazgos de Liu y cols. (1993b), quienes demuestran, mediante inserciones de Tn10 en *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, la conservación presentada en el orden de 60 genes mapeados. Así, tampoco es extraño que los genes de porinas tengan una alta similitud entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, hecho que ya habíamos constatado en parte, por la reacción cruzada de OmpE de *Ecc* 71 con anticuerpos contra OmpC de *S. typhi* y contra OmpF de *S. typhimurium*. Con todas estas consideraciones, es posible esperar recombinación homóloga entre ellos. Ahora bien, de todos los ensayos de transducción realizados y mutantes aisladas, sólo se encontró un tipo de mutante deficiente en una proteína de ME, por lo que podemos deducir que *Ecc* 71 presenta una sola proteína con una alta similitud con OmpC u OmpF. No fué posible obtener mutantes por transducción con lisados de *S. typhimurium ompD* :: Tn10, lo que posiblemente esté indicando que no existe tal gen en *Ecc* 71 o por lo menos con identidad suficiente como para hacer recombinación con *ompD*.

Se determinó la virulencia de los clones mutantes OmpE⁽⁻⁾, inoculándolos en tubérculos de papas, y se calculó el porcentaje de maceración de cada clon con respecto al macerado producido por la cepa nativa *Ecc* 71, considerado como el 100%. Los resultados estarían indicando una reducción en la virulencia entre del 40 - 62% con respecto a la cepa nativa. La reducción de virulencia en cepas que han sufrido alteraciones en su superficie celular, ya había sido descrito para algunas

bacterias fitopatógenas (Expert y Toussaint, 1985), con modificaciones en el LPS y susceptibles a EDTA, (Tharaud y cols., 1994); otras no móviles, presentando también sensibilidad a SDS y desoxicolato-citrato y con alteraciones en el ensamblaje de flagelos (Mulholland y cols., 1993); además de los hallazgos de Dorman y cols., 1989, que indican que las porinas de ME son necesarias para la virulencia de *S. typhimurium* en animales. Nuestros resultados estarían sugiriendo, que la ausencia de una de las proteínas mayores, en la superficie de *Ecc 71*, se convierte en una desventaja para enfrentar a su hospedero. La reducción de virulencia podría estar dada por una incapacidad de las mutantes de reproducirse rápidamente dentro del hospedero, ya que hemos visto que su velocidad de crecimiento es menor que la cepa nativa, y que por otra parte, su capacidad de degradar el parénquima del tubérculo de papa también se encuentra disminuída, por lo que la obtención de nutrientes va a ser más lenta. Todo lo anterior resulta en una desventaja para vivir a expensas del hospedero, y resistir sus mecanismos defensivos. El tejido de los tubérculos intactos se encuentran normalmente en un estado de adormecimiento relativo, y que será roto si se produce un corte y exposición de las células internas al oxígeno. Este daño desencadena una serie de cambios metabólicos, los que están dirigidos a la suberización de células periféricas, síntesis de proteínas, y división celular, entre otros. La producción de suberina y formación de peridermo estarán condicionados a los niveles de O_2/CO_2 existentes en el medio, siendo inhibidos si la presión parcial de O_2 es menor, o bien, si la presión parcial de CO_2 es mayor que los niveles encontrados en la atmósfera (Lyon, 1989). La respuesta defensiva del tubérculo de papa entonces, estará también condicionada por la velocidad con que las bacterias puedan multiplicarse, consumir O_2 y producir CO_2 dentro de éste, y por ende, la posibilidad que éstas puedan desarrollar su actividad macerante.

Sin embargo, Karlsson y cols., 1991, han aislado una mutante de *Ecc* (SCC3193) sin la proteína parecida-a-porina, obtenida por inactivación del locus *ompRS* de la bacteria, un sistema regulatorio análogo al *ompR/envZ* de *E. coli*, mediante mutagénesis por intercambio de marca con un plasmidio portador de una inserción mini-kan en *ompR* de *Ecc*. Los ensayos de virulencia fueron realizados inoculando suspensiones de 10^6 bacterias en la superficie de plántulas axénicas de tabaco, las que fueron seguidas hasta su maceración completa. De estos resultados, han sugerido que tal proteína no sería necesaria para la virulencia de la bacteria.

Dado que los ensayos de virulencia utilizados en ambos casos son diferentes, que las cepas utilizadas en los estudios no son las mismas y que pudiese tratarse además de una proteína de ME distinta en las dos cepas, no sería posible comparar la virulencia de nuestras mutantes con las de ese otro grupo de trabajo. Es más, la mutante obtenida por Karlsson y cols., posee una mutación en un sistema de regulación de síntesis de porinas, mientras las nuestras son mutantes de una porina específica; esos autores no aclaran la presencia en el electroforetograma de proteínas de ME, de una nueva banda de proteínas presente por sobre la porina que se perdería con la mutación, hecho que podría ser importante, ante la probable mantención de su virulencia.

3.- Recuperación del fenotipo virulento en las mutantes $OmpE^{(-)}$.

Basándose en el hecho que estas mutantes poseen en sus cromosomas un gen *ompC* de *S. typhimurium* con un inserto Tn10, se hizo transducción de fragmentos cromosómicos desde la cepa silvestre *S. typhimurium* MS1, a las cepas mutantes 311, 19, 20 y 22 de *Ecc* 71, mediante el fago P22. Se usó la estrategia de aislar clones sensibles a tetraciclina, en el medio de cultivo Bochner-

Maloy, en el que se desarrollarían sólo aquellas bacterias que hubiesen realizado un nuevo evento de recombinación homóloga, ahora entre el gen *ompC* :: Tn10 de su cromosoma y el gen *ompC* de *S. typhimurium* del fragmento transducido, y perdiendo la resistencia a tetraciclina. El análisis de proteínas de membrana externa de los clones sensibles a tetraciclina, indicó que ninguna de ellos expresaba OmpC de *S. typhimurium*. Probablemente existe un problema de tipo estérico que impide que se realice un nuevo evento de recombinación entre los marcadores genéticos señalados, por lo ha resultado imposible aislar un clon que exprese OmpC. El haber aislado clones sensibles a tetraciclina OmpE⁽⁻⁾, probablemente se debe a una pérdida espontánea del transposon Tn10, pero que en ningún caso permitió recuperar un gen *ompE* funcional.

Se recurrió a la complementación del fenotipo OmpE⁽⁻⁾ de los clones mutantes, con el gen *ompC* de *S. typhi*, usando como vector el plásmido pSTP2B1. Se obtuvo un sólo clon transformante, el clon 311(5), del cual se aisló un plásmido que correspondía con aquél usado en la transformación. Al hacer el análisis de proteínas de ME de esta cepa, se pudo observar una banda con migración idéntica a la que correspondía a OmpC de *S. typhi* en la cepa de *E. coli* que llevaba el plásmido que se usó en la transformación. Sin embargo, el clon 311(5) mostró una ausencia casi completa de la proteína señalada en este trabajo como OmpA. Alberti y cols., (1995) han informado que al introducir en *E. coli* un plásmido que contiene el gen que codifica para la porina OmpK36 de *Klebsiella pneumoniae*, se produce la reducción o la desaparición en la expresión de las porinas endógenas de *E. coli*; así mismo, este hecho ha sido documentado antes acerca de genes que codifican Omps (Agüero y cols., 1987; Zaror, 1989b; Puente y cols., 1991; Woodruff y cols., 1986).

La "curación" del clon 311(5) , revirtió este fenómeno, ya que la cepa mutante al perder el plásmido conteniendo la información genética para OmpC de *S. typhi*, volvió a los niveles de expresión originales para OmpA de *Ecc 71*.

Se realizaron ensayos para medir la virulencia del clon 311(5) en tubérculos de papa. Los resultados indicaron que este clon poseía menor virulencia que su cepa de origen, la 311 OmpE⁽⁻⁾. Probablemente, tanto el hecho que exista una sobreproducción de una proteína de superficie, como el que esta proteína no sea la original de *Ecc 71*, contribuyen a que esta bacteria tenga aún menos éxito en desarrollar un cuadro infectivo comparada con la cepa 311, en la que solamente se había perdido OmpE. Debemos deducir de este hecho, que ha sido imposible complementar con OmpC de *S. typhi* la deficiencia de OmpE en los clones OmpE⁽⁻⁾. Por otra parte, el estudio de estabilidad del plásmido dentro de las bacterias 311(5), indicó que una vez inoculadas en los tubérculos de papas, éstas se iban haciendo más sensibles a ampicilina, lo que indicaba la pérdida del plásmido. Así, la complementación del fenotipo OmpE⁽⁻⁾ por el gen *ompC* de *S. typhi* no fué efectiva.

La tercera estrategia que se intentó abordar, para recuperar el fenotipo OmpE en los clones mutantes, fué el de "intercambio de marcas genéticas". Este método, que ha sido usado por diferentes investigadores (Torriani, 1960; Roeder y Collmer, 1985; Lindeberg y Colmer, 1991), requiere de la introducción de un gen clonado en una bacteria hospedante, producir la inestabilidad de esta información genética por cultivo de las bacterias en un medio pobre en fosfatos, lo que lleva a seleccionar eventos de recombinación entre la información genética que se encuentran en el cromosoma y aquélla contenida en el plásmido.

Se realizaron innumerables ensayos , en los que se mantuvo a la cepa 311(5), conteniendo el gen *ompC* de *S. typhi*, en un medio de cultivo de bajo

contenido en fosfatos. De todas los clones analizados, ninguno mostró haber adquirido la información genética para producir proteína OmpC de *S. typhi*, lo cual estaría indicando o que no hubo intercambio de marca, o que la información genética recombinada y presente en el cromosoma no es funcional.

A pesar de no haber tenido éxito en recuperar el fenotipo virulento de las mutantes OmpE(-), y así probar definitivamente que esta proteína es la responsable de la pérdida de virulencia de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71, cada día son mayores las evidencias que están indicando que las porinas de la membrana externa de bacterias patógenas, como *Salmonella*, *Bordetella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas*, juegan un papel importante en sus mecanismos de virulencia (Alberti y cols., 1995; Finn y cols., 1995; Quinn y cols., 1994).

CONCLUSIONES

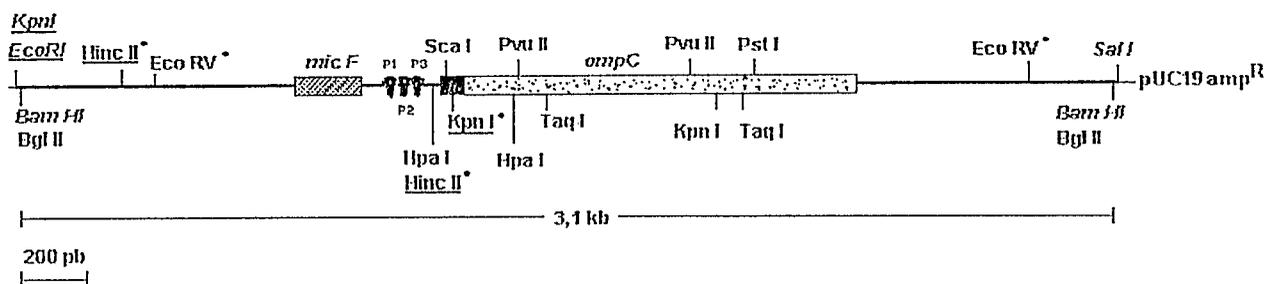
- 1.-El análisis electroforético de las proteínas de membrana externa de *Ecc* 71, demostró que dos de las proteínas mayores, las de 40 kDa y 37,9 kDa, se comportan como complejos proteicos en su estado nativo. La proteína de 40 kDa pertenecería a las denominadas "proteínas modificables por calor", mientras la proteína de 37,9 kDa exhibiría características similares a aquellas proteínas de membrana externa de *Enterobacteriaceae* denominadas porinas.
- 2.-Por la reacción presentada por estas proteínas frente a anticuerpos contra OmpC de *Salmonella typhi*, y una mezcla de anti- OmpF y OmpA de *S. typhimurium*, se podría concluir que la proteína de 37,9 kDa presenta alguna homología con OmpC o con OmpF; mientras la proteína de 40 kDa sería homóloga a OmpA de *Salmonella typhimurium* o de *E. coli*.
- 3.- Ambas proteínas presentan una expresión regulable por condiciones del medio, siendo la principal de ellas, la osmolaridad. La proteína de 37,9 kDa muestra un patrón de regulación semejante al de OmpF, mientras la proteína de 40 kDa pareciera ser regulada en forma opuesta a la anterior, regulación que hasta ahora no había sido descrita para una proteína parecida a Omp A.
- 4.-La regulación de la expresión de OmpE de *Ecc* 71 semeja aquella de OmpF de *E. coli*, *S. typhimurium* o *S. typhi*. La expresión de la proteína OmpE es regulable por *micF* de *S. typhi*, lo cual significa que el mRNA de *ompE* debe presentar

alguna secuencia complementaria a la del RNA de *micF*, y que permita regular la expresión de esta proteína a nivel traduccional.

- 5.- Es posible realizar transducción de marcas genética a *Ecc*, utilizando como herramienta al fago P22, bacteriófago específico para *Salmonella*.
- 6.- Se ha probado que los genes *ompE* de *Ecc* 71 y *ompC* de *S. typhimurium* pueden realizar recombinación entre ellos.
- 7.-La pérdida de proteína OmpE en la membrana externa de *Ecc* 71, produjo la disminución en la virulencia de las mutantes, cuando fueron inoculadas en tubérculos de papas. Los clones mutantes presentaron alteración en su velocidad de crecimiento; en su capacidad de hidrolizar poligalacturonato y celulosa en el medio externo; así como aumentaron su resistencia a los antibióticos cefaloridina, cloranfenicol y algunos también a ácido nalidíxico. La actividad hidrolítica sobre gelatina permaneció inalterada.
- 8.-*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 311 (OmpE⁽⁻⁾) transformada con un plásmido conteniendo el gen *ompC* de *S. typhi* fue capaz de expresar esta proteína y de localizarla en su membrana externa. Sin embargo, el haber adquirido la porina OmpC no restableció su virulencia.

APÉNDICE

A pSTP2B1



B pSTP2Kmic

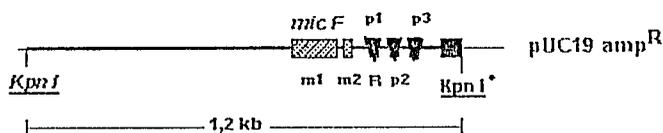


Figura 32. Esquema de las construcciones pSTP2B1 (A) y pSTP2Kmic (B), y tamaños de cada fragmento en kb.

(A) La barra, que indica un largo de 3,1 kb corresponde a la región cromosomal de *S. typhi*, que contiene los genes *ompC* y *micF*. La zona punteada indica la región que codifica la proteína madura y la zona negra a la que codifica el péptido señal. Los triángulos invertidos representan los tres promotores de *ompC*, y la zona achurada el gen *micF* que posee una orientación transcripcional opuesta a *ompC*. También se señalan algunos sitios de restricción.

(B) El plásmido pSTP2Kmic deriva de pSTP2B1, por digestión de éste con la enzima de restricción *KpnI*, y ligamiento del fragmento que contiene *micF* a pUC 19. Se señalan los dos promotores de *micF* (m1 y m2) y elementos de inicio del gen *ompC*.

BIBLIOGRAFÍA.

- Agüero, J., Mora, C., Mroczenski-Wildey, M. J., Fernández-Beros, M.E.; Aron, L., Cabello, F. C. 1987. Cloning, expression and characterization of the 36 kDal *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **3**: 399 - 407.
- Alberti, S., Rodríguez-Quiñones, F., Schirmer, T., Rummel, G., Tomás, J., Rosenbush, J. P., Benedí, V. 1995. A porin from *Klebsiella pneumoniae*. Sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infec. Immun.* **63**: 903-910.
- Andersen, J., Forst, S.A., Zhao, K., Inouye, M., Delihias, N. 1989. The function of *micF* RNA : *micF* RNA is a mayor factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**: 17961 - 17970.
- Andro, T., Chambost, J. P., Kotoujansky, A., Cattaneo, J., Bertheau, Y., Barras, F., Van Gijsegem, F., Coleno, A. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacteriol.* **160**: 1199 - 1203.
- Argast, M. , Boos, W. 1980. Co-regulation in *Escherichia coli* of a novel transport system for *sn*-glycerol-3-phosphate and outer membrane protein Ic (e, E) with alkaline phosphatase and phosphate binding protein. *J. Bacteriol.* **143**: 142 - 150.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1. Unit 2.4. Pág. 2.4.1 y 2.4.2 . Greene Publ. Associates and Wiley Interscience.
- Barve, S. S., Straley, S. C. 1990. *IcrR*, a low-Ca²⁺-response locus with dual Ca²⁺-dependent functions in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **172**: 4661 - 4671.
- Bateman, D. F., Millar, R. L. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.* **4**: 119 - 146.
- Bauer, K., Benz, R., Brass, J., Boos, W. 1985. *Salmonella typhimurium* contains an anion-selectivity outer membrane porin induced by phosphate starvation. *J. Bacteriol.* **161**: 813 - 816.
- Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J. 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* **44**: 4799 - 4805.
- Baydoun, E. A. H., Fry, S. C. 1985. The immobility of pectic substance in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* **165**: 269 - 276.
- Beaulieu, C., Boccara, M., Vangijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase - defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 197 - 202.

- Bellido, F., Martin, N. L., Siehnel, R. J., Hancock, R. E. W. 1992. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 174: 5196 - 5203.
- Benz, R., Ishii, J., Nakae, T. 1980. Determination of ion permeability through the channels made of porins from the outer membrane of *Salmonella typhimurium* in lipid bilayer membranes. *J. Memb. Biol.* 56: 19 - 29.
- Benz, R. 1985. Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. *Crit. Rev. Biochem.* 19: 145 - 190.
- Benz, R. (1988). Structure and function of porins from Gram - negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 359 - 383.
- Benz, R., Bauer, K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of Gram-negative bacteria. Review of bacterial porins. *Eur. J. Biochem.* 176: 1 - 9 .
- Beraha, L., Garber, E. D. 1971. Avirulence and extracellular enzymes of *Erwinia carotovora*. *Phytopathol. Z.* 70: 335 - 344.
- Bergman, T., Hakansson, S., Forsberg, A., Norlander, L., Macellaro, A., Bäckman, A., Bölin, I., Wolf-Watz, H. 1991. Analysis of the V antigen *lcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of LcrH y LcrV. *J. Bacteriol.* 173: 1607 - 1616.
- Bernardini, M. L., Fontaine, A., Sansonetti, P. J. 1990. The two-component regulatory system OmpR-EnvZ controls the virulence of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172: 6274 - 6281.
- Bernardini, M. L., Sanna, M. G., Fontaine, A., Sansonetti, P. J. 1993. OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 61: 3625 - 3635.
- Blazevic, D. J., Ederer, G. M. 1975. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. John Wiley & Sons. (Eds).
- Braun, V. 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli* *Biochim. Biophys. Acta* 415: 335 - 337.
- Brenner, D. J. 1984. Facultatively anaerobic Gram-Negative rods. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Section 5. pp. 408-420. N. R. Krieg, J. G. Holt (eds.). The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Cappaert, M. R., Powelson, M. L., Franc, G. D., Harrison, M. D. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot *erwinias* for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathol.* 78: 1668 - 1672.
- Chassy, B. M., Mercenier, A., Flikinger, J. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. *TIBTECH.* 6: 303 - 307.

- Chatfield, S. N., Dorman, C. J., Hayward, C., Dougan, G. 1991. Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both OmpC and OmpF are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 59: 449 - 452.
- Chatterjee, A. K., Starr, M. P. 1972. Transfer among *Erwinia* spp. and other enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors. *J. Bacteriol.* 112: 576 - 584 .
- Chatterjee, A. K., Thurn, K. K., Tyrell, D. J. 1985. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Erwinia chrysanthemi* that are deficient in polygalacturonate catabolic enzymes oligogalacturonate lyase and 3-deoxy-D-glycero-2,5-hexodiulose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 162: 708 - 714.
- Chopra, I., Eccles, S. J. 1978. Diffusion of tetracycline across the outer membrane of *Escherichia coli* K12: Involvement of protein Ia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 550 - 557.
- Chou, J. H., Greenberg, J. T., Demple, B. 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* 175: 1026 - 1031.
- Clark, V. L., Campbell, L. A., Palermo, D. A., Evans, T. M., Klimpel, K. W. 1987. Induction and repression of outer membrane proteins by anaerobic growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 55: 1359 - 1364.
- Coleman, J., Green, P. J., Inouye, M. 1984. The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* 37: 429 - 436.
- Collmer, A., Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 383 - 409.
- Corbin, D. R., Sauer, N., Lamb, C. J. 1987. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell. Biol.* 7: 6337 - 6344.
- Cuppels, D., Kelman, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64 : 468 - 475.
- Daniels, M. J. 1984. Molecular biology of bacterial plant pathogens. *Microbiol. Sci.* 1: 33 - 36.
- De Boer, S. H., Kelman, A. 1978. Influence of oxygen concentration and storage factors on susceptibility of potato tubers to bacterial soft rot (*Erwinia carotovora*). *Potato Res.* 21: 65 - 80.
- De Boer, S. H. 1983. Frequency and distribution of *E. carotovora* associated with potatoes in the Pemberton Valley of British Columbia. *Can. Plant Pathol.* 5: 279-284.

- Delihas, N. 1995. Regulation of gene expression by *trans*-encoded antisense RNA. *Mol. Microbiol.* 15: 411 - 414.
- Demple, B. 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Ann. Rev. Genet.* 25: 315 - 337.
- Destéfano-Beltrán, L., Nagpala, P. G., Cetiner, S. M., Dodds, J. H., Jaynes, J. M. 1990. Enhancing bacterial and fungal disease resistance in plants : Application to Potato. Cap. 15, pp. 205 - 221.
- Dickey, R. S. 1979. *Erwinia chrysanthemi*: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. *Phytopathology* 69: 324 - 329.
- Dickey, R. S. 1981. *Erwinia chrysanthemi*: Reaction of eight plant species to strains from several hosts and to strains of other *Erwinia* species. *Phytopathology* 71: 23-29.
- Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C., Dougan, G. 1989. Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*. *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect. Immun.* 57: 2136-2140.
- Enard, C., Diolez, A., Expert, D. 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* 170: 2419 - 2426.
- Ernst, R. K., Dombroski, D. M., Merrick, J. M. 1990. Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of Hep-2 cells by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 58: 2014 - 2016.
- Esterling, L., Delihas, N. 1994. The regulatory RNA gene *micF* is present in several species of Gram-negative bacteria and is phylogenetically conserved. *Mol. Microbiol.* 12: 639 - 646.
- Expert, D., Toussaint, A. 1985. Bacteriocin resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi* possible involvement of iron acquisition in phytopathology. *J. Bacteriol.* 163: 221-227.
- Finn, T.H., Li, Z., Kocsis, E. 1995. Identification of a *Bordetella pertussis* *bvg*-regulated porin-like protein. *J. Bacteriol.* 177: 805 -809.
- Forst, S., Inouye, M. 1988. Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 21 - 42.
- Forst, S., Delgado, J., Inouye, M. 1989. DNA-binding properties of the transcription activator (OmpR) for upstream sequences of *ompF* in *Escherichia coli* are altered by *envZ* mutations and medium osmolarity. *J. Bacteriol.* 171: 2949 - 2955.

- Garibaldi, A., Bateman, D. F. 1971. Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 1: 25 - 40.
- Goldberg, M. B., Boyko, S. A., Calderwood, S. B. 1990. Transcriptional regulation by iron of a *Vibrio cholerae* virulence gene and homology of the gene to the *Escherichia coli* *fur* system. *J. Bacteriol.* 172: 6863 - 6870.
- Green, P. J., Pines, O., Inouye, M. 1986. The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 569 - 597.
- Gutmann, L., Williamson, R., Moreau, R., Kitzis, M-D., Collatz, E., Acar, J. F., Goldstein, F. W. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia*. *J. Infect. Dis.* 151 : 502 - 507.
- Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., Murgier, M., Lazdunski, A. 1990. The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* protease and *Escherichia coli* *a*-haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5 : 447 - 453.
- Hale, T. L. 1991. Genetic basis for virulence in *Shigella* species. *Microbiol. Rev.* 55 : 206 - 224.
- Hall, M. N., Silhavy, T. J. 1979. Transcriptional regulation of *Escherichia coli* K12 major outer membrane protein 1B. *J. Bacteriol.* 140: 342 - 350.
- Hancock, R. E. W., Nikaido, H. 1978. Outer membrane of Gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.* 136: 381 - 390.
- Hancock, R. E. W. 1987. Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* 169: 929 - 933.
- Handa, A. K., Bressan, R. A., Kerty, A. G., Jayaswal, R. K., Charles, D. L. 1987. Isolation and characterization of pectolytic nonpathogenic mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc). En *Proc. 6th Int Conf Plant Path Bact.* Civerolo, E. L., Collmer, A., Davis, R. E., Gillaspie, A. G. (eds). Maryland. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 212 - 217.
- Harder, K. J., Nikaido, H., Matsushashi, M. 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain β -lactam compounds lack the OmpF porin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20 : 549 - 552.
- Harder, W., Dijkhuizen, L. 1983. Physiological response to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 1 - 23.
- He, S. Y., Lindeberg, M., Chatterjee, A., Collmer, A. 1991. Cloned *Erwinia chrysanthemi* *out* enable *Escherichia coli* to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins to its milieu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 1079 - 1083.

- Hinton, J. C. D., Sidebotham, J. M., Hyman, L. J., Pérombelon, M. C. M., Salmond, G. P. C. 1989. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* exhibiting reduced virulence. *Mol. Gen. Genet.* 217: 141- 148.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21: 243 - 269.
- Hofstra, H., Dankert, J. 1980. Major outer membrane proteins: common antigens in *Enterobacteriaceae* species. *J. Gen. Microbiol.* 119: 123 - 131.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Reverchon, S., Condemine, G., Robert - Badouy, J. 1986. Regulatory mutations affecting the synthesis of pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2099 - 2106.
- Inokuchi, K., Mutoh, N., Matsuyama, S., Mizushima, S. 1982. Primary structure of the *ompF* gene that encodes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 10: 6957 - 6968.
- Ishimaru, C. A., Loper, J. E. 1992. High-affinity iron uptake systems present in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* include the hydroxamate siderophore aerobactin. *J. Bacteriol.* 174: 2993 - 3003.
- Jaffé, A., Chabbert, Y., A., Semonin, O. 1982. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 : 942 - 948.
- Jair, K-W., Martin, R. G., Rosner, J. L., Fujita, N., Ishihama, A., Wolf, R. E. Jr. 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J. Bacteriol.* 177 : 7100 - 7104.
- Ji, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J. 1987. Use of *Mu-lac* insertions to study the secretion of pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 793 -802.
- Ji, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Robert-Baudouy, J. 1989. Molecular cloning of the *outJ* gene involved in pectate lyase secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 3: 285 - 293.
- Jones, S., Yu, B., Baiton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J. R., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S., Winson, M. K., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. 1993. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* 12: 2477 - 2482.
- Kamoun, S., Kado, C. I. 1990. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3855 - 3860.

- Karlsson, M., Pirhonen, M., Saari-lahti, H. T., Palva, E. T. 1991. Molecular cloning of *ompRS*, a regulatory locus controlling production of outer membrane proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 353 - 360.
- Kawajji, H., Mizuno, T., Mizushima, S. 1979. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextran on the synthesis of outer membrane protein O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 140: 843 - 847.
- Keen, N. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B., Belser, W. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159: 825 - 831.
- Keen, N. T. 1988. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 421 - 440.
- Kelemu, S., Collmer, A. 1993. *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1756 - 1761.
- Korterland, J., Tommassen, J., Lugtenberg, B. 1982. PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 690: 282 - 289.
- Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft - rot erwinias. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 405 - 430.
- Krawiec, S., Riley, M. 1990. Organization of the bacterial genome. *Microbiol. Rev.* 54: 502 - 539.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680 - 685
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., Dixon, R. A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215 - 224.
- Leben, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3: 209 - 230.
- Lee, C. A., Falkow, S. 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4304 - 4308.
- Lelliott, R. A., Dickey, R. S. 1984. Genus *Erwinia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Section 5. pp. 469 - 476. N. R. Krieg, J. G. Holt (eds.) The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Li, Z., Demple, B. 1994. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 18371 - 18377.

- Lindeberg, M., Collmer, A. 1992. Analysis of eight *out* genes in a cluster required for pectic enzyme secretion by *Erwinia chrysanthemi*: Sequence comparison with secretion genes from other Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 174: 7385 - 7397.
- Liu, S. L., Hessel, A., Sanderson, K. E. 1993a. The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2, determined by double digestion, end-labelling, and pulsed-field gel electrophoresis. J. Bacteriol. 175: 4104 - 4120.
- Liu, S. L., Hessel, A., Sanderson, K. E. 1993b. The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella enteritidis* shows an inversion relative to *Salmonella typhimurium* LT2. Mol. Microbiol. 10: 655 - 664.
- Lobos, S., Mora, G. C. 1991. Alteration in the electrophoretic mobility of OmpC due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 12: 448- 450.
- Lory, S. 1992. Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 174: 3423 - 3428.
- Lyon, G.D. 1989. The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp. - a review. Plant Pathol. 38: 313 - 339.
- Maher, E. A., Kelman, A. 1983. Oxygen status of potato tuber tissue in relation to maceration by pectic enzymes of *Erwinia carotovora*. Phytopathology 73: 536 - 539.
- Maloy, S. R., Nunn, W. D. 1981. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 145: 1110 - 1112.
- Maloy, S. R. 1990. Experimental techniques in bacterial genetics. Pág. 63. Jones and Barlett Publishers. Boston.
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem. 87: 206 - 210 .
- Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol. 174: 1 - 7.
- Miller, J. H. 1977. Experiments in molecular genetics, p. 432. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Miller, V. L., Mekalanos, J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 170: 2575 - 2583.

- Mizuno, T., Wurtzel, E. T., M., Inouye, M. 1982. Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the *envZ* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J. Biol. Chem.* 257: 13692 - 13698.
- Mizuno, T., Chou, M. Y., Inouye, M. 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene. *J. Biol. Chem.* 258: 6932 - 6940.
- Mizuno, T., Chou, M. Y., Inouye, M. 1984. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1966 - 1970.
- Mizuno, T., Mizushima, S. 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* 4: 1077 - 1082.
- Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P., Cornelis, G. 1989. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect. Immun.* 57: 2534 - 2541.
- Mulholland, V., Hinton, J. C. D., Sidebotham, J., Toth, I. K., Hyman, L. J., Pérombelon, M. C. M., Reeves, P. J., Salmond, G. P. C. 1993. A pleiotropic reduced virulence (Rvi⁻) mutant of *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal pathogens. *Mol. Microbiol.* 9: 343 - 356.
- Murata, H., Fons, M., Chatterjee, A., Collmer, A., Chatterjee, A. K. 1990. Characterization of transposon insertion *Out*⁻ mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* defective in enzyme export and of a DNA segment that complements *out* mutations in *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, and *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 172: 2970 - 2978.
- Nakae, T., Nikaido, H. 1975. Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*. Penetration of oligo- and polysaccharides into isolated outer membrane vesicles and cells with degraded peptidoglycan layer. *J. Biol. Chem.* 250: 7359 - 7365.
- Nakae, T. 1986. Outer membrane permeability of bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13: 1 - 62.
- Nguyen, T. T., Postle, K., Bertrand, K. P. 1983. Sequence homology between the tetracycline-resistance determinants of Tn 10 and pBR322. *Gene* 25: 83 - 92.
- Ni Bhriain, N., Dorman, C. J., Higgins, C. F. 1989. An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* 3: 933 - 942.
- Nikaido, H., Song, S. A., Shaltiel, L., Nurminen, M. 1977. Outer membrane of *Salmonella*. XIV. Reduced transmembrane diffusion rates in porin deficient mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 : 324 - 330.

- Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49: 1 - 32.
- Nikaido, H. 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microb.* 6 : 435 - 442.
- Nikaido, H. 1994. Porins and Specific Diffusion Channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* 269: 3905 - 3908.
- Obreque, V. H. 1992. Estudio de la expresión de genes regulados anaerobicamente en *S. typhi*. Tesis para optar al título de Bioquímico de la Universidad de Concepción.
- Osborn, M. J., Wu, H. C. P. 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 4: 369 - 422.
- Overbeeke, N., Bergmans, H., van Mansfeld, F., Lugtenberg, B. 1983. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* 163: 513 - 520.
- Perkins, J. P., Heath, J. D., Sharma, B. R. Weistock, G. M. 1993. *Xba*I and *Bln*I genomic cleavage maps of *Escherichia coli* K12 strain MG 1655 and comparative analysis of other strains. *J. Mol. Biol.* 232: 419 - 425.
- Pérombelon, M. C. M., Lowe, R. 1975. Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. *Potato Res.* 18: 64 - 82.
- Pérombelon, M. C. M., Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 361 - 387.
- Persmark, M., Expert, D., Neilands, J. B. 1989. Isolation, characterization, and synthesis of chrysoactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* 264: 3187 - 3196.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M., Palva, E. T. 1991. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant - Microbe Interact.* 4: 276 - 283.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12: 2467 - 2476.
- Powelson, M. L., Apple, J. D. 1984. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *E. carotovora* pv. *carotovora* for stem rot of potatoes. *Phytopathol.* 74: 429 - 432.
- Pratt, L., Silhavy, T. J. 1995. Porin regulon of *Escherichia coli*. En *Two-component Signal Transduction*. J. A. Hoch, T. J. Silhavy (eds.) Washington, D. C. The American Society for Microbiology. pp. 105 - 127.

- Pratt, L., Hsing, W., Gibson, K. E., Silhavy, T. J. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20: 911 - 917.
- Puentes, J. L., Verdugo-Rodríguez, A., Calva, E. 1991. Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol.* 5: 1205 - 1210.
- Pugsley, A. P., Schnaitman, C. A. 1978. Identification of three genes controlling production of new outer membrane pore proteins in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 135: 1118 - 1129.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50 - 108.
- Quinn, D. M., Atkinson, H. M., Bretag, A. H., Tester, M., Trust, T. J., Wong, C. Y. F., Flower, R. L. P. 1994. Carbohydrate-reactive, pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 62: 4054 - 4058.
- Raetz, C. R. H., Ulevitch, R. J., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A., Nathan, C. F. 1991. Gram-negative endotoxin: An extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB Journal* 5: 2652 - 2660.
- Randall, L. L., Hardy, S. J., Thom, J. R. 1987. Export of protein: A biochemical view. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 507 - 541.
- Reeves, P. J., Whitcombe, D., Wharam, S., Gibson, M., Allison, G., Bunce, N., Barallon, R., Douglas, P., Mulholland, V., Stevens, S., Walker, D., Salmond, G.O.C. 1993. Molecular cloning and characterization of 13 *out* genes from *Erwinia carotovora* spp. *carotovora*. Genes encoding members of a general secretion pathway (GSP) wide-spread in gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 8: 443-456.
- Rietschel, E.T., Brade, H. 1992. Endotoxinas bacterianas. *Invest. y Ciencia*, Oct: 17-24
- Riley, M., Sanderson, K.E. 1990. Comparative genetics of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. En *The Bacterial Chromosome*. Drlica, K., Riley, M. (eds), American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 85 - 95.
- Robert-Baudouy, J. 1991. Molecular biology of *Erwinia*: from soft-rot to antileukaemics. *TIBTECH.* 9: 325 - 329.
- Roeder, D. L., Collmer, A. 1985. Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isozyme gene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 164: 51 - 56.
- Ronson, C. W., Nixon, B. T., Ausubel F. M. 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell* 49: 579 : 581.
- Sanderson, K. E., Roth, J. R. 1988. The linkage map of *Salmonella typhimurium*. edition VII. *Microbiol. Rev.* 52: 485 - 532.

- Salmond, G. P. C., Reeves, P. J. 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 18: 7 - 12
- Shevchik, V. E., Evtushenkov, A. N., Babitskaya, H. V., Fomichev, Y. K. 1992. Production of pectolitic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources. *World J. Microbiol. Biotech.* 8: 115 - 12
- Schiemann, D. A., Shope, S. R. 1991. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells *in vitro* and repression of a mayor outer membrane protein. *Infect. Immun.* 59: 437-440.
- Shimamura, T., Watanabe, S., Sasaki, S. 1985. Enhancement of enterotoxin production by carbon dioxide in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 49: 455 - 456.
- Schoonejans, E., Expert, D., Toussaint, A. 1987. Characterization and virulence properties of *Erwinia chrysanthemi* lipopolysaccharide - defective, Phi EC2-resistant mutants. *J. Bacteriol.* 169: 4011 - 4017.
- Starr, M. P., Mandel, M. 1950. The nutrition of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal nutritive requirements of the genus *Erwinia*. *J. Bacteriol.* 60: 669 - 672.
- Starr, M. P., Chatterjee, A. K. 1972. The genus *Erwinia*: Enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 389 - 426.
- Starr, M. P. 1981a. Prokaryotes as Plant Pathogens. En M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel (eds.) *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* Section A. pp. 123-134. Springer - Verlag, New York.
- Starr, M. P. 1981b. The Genus *Erwinia*. En M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H. G. Schlegel (eds.) *The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* Section B. pp. 1260-1271. Springer-Verlag, New York.
- Storey, D. G., Frank, D. W., Farinha, M. A., Kropinski, A. M., Iglewski, B. H. 1990. Multiple promoters control the regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *regA* gene. *Mol. Microbiol.* 4: 499 - 503.
- Sugawara, E., Nikaido, H. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 2507 - 2511.
- Teather, R. M., y Wood, P. J. 1982. Use of Congo Red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. and Envirom. Microb.* 43: 777 - 780.
- Tharaud, M., Menggad, M., Paulin, J. P., Laurent, J. 1994. Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology* 140: 659 - 669.

- Thurn, K. K., Chatterjee, A. K. 1985. Single-site chromosomal Tn5 insertions affect the export of pectolytic and cellulolytic enzymes in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 894 - 898.
- Tokunaga, M., Tokunaga, H., Okajima, Y., Nakae, T. 1979. Characterization of porins from outer membrane of *Salmonella typhimurium*. 2 Physical properties of the functional oligomers. *Eur. J. Biochem.* 95: 441 - 448.
- Torriani, A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 38: 460 - 479.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 7897 - 7901.
- Tsuyuma, S., Chatterjee, A. K. 1984. Pectin lyase production in *E. chrysanthemi* and other soft - rot *Erwinia* species. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 291 - 302.
- van Alphen, W., Lugtenberg, B. 1977. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 131: 623 - 630.
- Villarejo, M., Davis, J. L., Granett, S. 1983. Osmoregulation of alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 156: 975 - 978.
- Wandersman, C. 1992. Secretion across the bacterial outer membrane. *TIG.* 8: 317-322.
- Wolfe, A. J., Berg, H. C. 1989. Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6973- 6977.
- Woodruff, W. A., Parr, T. J., Hancock, R. E., Hanne, L. F., Nicas, T. I., Iglewski, B. H. 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* 167: 473 - 479.
- Wurtzel, E. T., Chou, M., Inouye, M. 1982. Osmoregulation of gene expression. I. DNA sequence of the *ompR* gene of the *ompB* operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J. Biol. Chem.* 257: 13685 - 13691.
- Zaror, M. I. 1989a. Aislamiento y caracterización del gen *ompC* de *Salmonella typhi*. Estudios estructurales y funcionales de la porina OmpC. Bases preliminares para el desarrollo de un sistema de detección de fiebre tifoidea. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular. P. Universidad Católica de Chile. pp. 96 - 117.
- Zaror, M. I. 1989b. Aislamiento y caracterización del gen *ompC* de *Salmonella typhi*. Estudios estructurales y funcionales de la porina OmpC. Bases preliminares para el desarrollo de un sistema de detección de fiebre tifoidea. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular. P. Universidad Católica de Chile. pp. 128.

- Zink, R. T., Kemble, R. J., Chatterjee, A. K. 1984. Transposon Tn5 mutagenesis in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. J. Bacteriol. 157: 809 - 814.