

Tesis de Posgrado

Aislamiento, caracterización, y relaciones filogenéticas de un bacteriófago de *Kluyvera* sp.

Gadaleta, Patricia Gladys

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gadaleta, Patricia Gladys. (1995). Aislamiento, caracterización, y relaciones filogenéticas de un bacteriófago de *Kluyvera* sp.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2784_Gadaleta.pdf

Cita tipo Chicago:

Gadaleta, Patricia Gladys. "Aislamiento, caracterización, y relaciones filogenéticas de un bacteriófago de *Kluyvera* sp.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2784_Gadaleta.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA
AREA MICROBIOLOGIA

TEMA DE TESIS
AISLAMIENTO, CARACTERIZACION, Y RELACIONES
FILOGENETICAS DE UN BACTERIOFAGO DE *Kluyvera sp.*

AUTOR
PATRICIA GLADYS GADALETA

DIRECTOR
DR. JORGE ZORZOPULOS

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

1995

A la memoria de mi padre,
a mi mamá,
a mi esposo y a mis hijos.

Quiero expresar mi agradecimiento,

Al Dr Jorge Zorzopulos cuyo espíritu de vanguardia en el área de microbiología me guió en la realización de este trabajo, y por su valiosa corrección.

A la Dra Celia Coto y a la Dra Beatriz Méndez por su constante apoyo y en especial por las facilidades concedidas en el uso de equipos y e instalaciones.

Al Dr Alberto Viale por darme la posibilidad de realizar mis primeros pasos en la investigación científica.

A la Dr Carmen Sánchez Rivas por sus sugerencia en los momentos compartidos en el mismo laboratorio y por su gentileza al traerme las cepas de *Kluyvera* del Instituto Pasteur.

A Julia Pettinari, Mónica Waschman, Diana Vullo, Laura Alche y Felix Columbie por su amistad y sus constantes palabras de estímulo.

A María Elisa Pavan por su esmerada colaboración.

A mis compañeros del Area de Microbiología por todos estos años de gratos momentos compartidos.

A la Sras Carmen Castro y Luli por el trabajo técnico y de limpieza del material.

A Diego Balestra por su apoyo incondicional, por la paciencia y ayuda inestimable durante las horas dedicada a este trabajo en nuestro hogar.

INDICE

INTRODUCCION

I. LOS BACTERIOFAGOS	5
Descubrimiento e historia	5
Ciclo biológico de un bacteriófago	6
Morfología y clasificación	8
Características generales del bacteriófago T7	13
Características del mapa genético de T7 y de su estrategia de replicación	14
"Grupo T7"	18
Familia <i>Podoviridae</i> y el "Grupo T7".	22
Sobre el origen y evolución del "Grupo T7"	23
II. BACTERIAS DEL GENERO <i>Kluyvera</i>	25
Características del género <i>Kluyvera</i>	27
Ecología y significancia clínica	30
Susceptibilidad a antibióticos	31
Otras características	31

MATERIALES Y METODOS

I. AISLAMIENTO DEL BACTERIOFAGO Y SU HUESPED	33
II. EL HUESPED	34
Caracterización bioquímica del huésped	34
Test de ascorbato	34
Test de fermentación de glucosa a 5 °C	35
Curva de crecimiento	35
Sensibilidad a antibióticos y metales pesados	36
Análisis de plásmidos	36
Susceptibilidad de la cepa 21 a otros fagos	37
III. EL BACTERIOFAGO	37
Preparación de stocks de fagos	37
Concentración de fagos	38
Purificación de las partículas virales	38
Curva de un solo ciclo	39
Microscopía electrónica de transmisión	39
Características del genoma viral	41
Rango de huéspedes	43
Composición de la partícula viral	44
Análisis cualitativo de proteínas virales	45
Efecto de agentes físicos y químicos	47
IV. DETERMINACION PARCIAL DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DEL GENOMA VIRAL	49

Clonado de fragmentos del genoma viral	49
Secuenciamiento del ADN del fago presente en los clones recombinantes	52
Mapeo de fragmentos clonados del genoma viral por hibridación con ADN del fago digerido con distintas enzimas de restricción e inmovilizado sobre membranas de nylon	53
RESULTADOS	
I. AISLAMIENTO DEL BACTERIOFAGO Y SU HUESPED	56
II. IDENTIFICACION DEL HUESPED	59
Caracterización bioquímica de la cepa 21	59
Curva de crecimiento y morfología micro y macroscópica de la cepa 21	63
Sensibilidad a antibióticos	65
Análisis de plásmidos	68
Resistencia a metales pesados	68
Susceptibilidad de la cepa 21 a otros fagos	68
III. CARACTERIZACION DEL BACTERIOFAGO	69
Características de las placas de lisis	69
Curva de un solo ciclo	70
Densidad de flotación de la partícula viral	72
Determinación del tipo de ácido nucleico del genoma viral	74
Microscopía electrónica de las partículas virales	77
Microscopía electrónica de cortes ultrafinos de bacterias infectadas	79
Rango de huéspedes	82
Espectro de absorción a la luz UV y porcentajes de ADN y proteína de la partícula viral	83
Análisis de las proteínas presentes en la partícula viral	85
Análisis de las proteínas sintetizadas en las células infectadas	87
Estabilidad y sensibilidad de Kvp1 a agentes físicos	91
Sensibilidad a solventes orgánicos	93
IV. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GENOMA DEL BACTERIOFAGO Kvp1 Y RELACIONES FILOGENETICAS	95
Análisis de la secuencias parcial del genoma de Kvp1	95
Mapeo por hibridación ADN-ADN de algunos fragmentos clonados	123
Arbol filogenético	127
DISCUSION	129
BIBLIOGRAFIA	135

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxiribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
BSA: seroalbumina bovina
°C: grados Celsius
DNAsa: desoxirribonucleasa
DO: densidad óptica
EDTA: etilendiaminotetracetato de sodio
ICTV: International Committee for Taxonomical of Virology
IPTG: isopropiltio- β -galactosido
LB: Luria - Bertani
M: molar
 μ Ci: microCurie
 μ g: microgramos
 μ l: microlitros
 μ m: micrometros
mg: miligramos
ml: mililitros
mm: milímetros
mM: milimolar
nm: nanometros
PEG: polietilenglicol
ppm: partes por millón
RNAsa: ribonucleasa
rpm: revoluciones por minuto
SDS: sodio dodecil sulfato
UFC: unidades formadoras de colonias
UFP: unidades formadoras de placas
UV: ultravioleta
Tris: tris-hidroximetil-aminometano
Xgal: 5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCION

I. LOS BACTERIOFAGOS

Descubrimiento e historia

Los virus bacterianos fueron descubiertos por F. W. Twort en 1915 quien los describió como agentes que producían una transformación vidriosa en colonias bacterianas.

La descripción de Twort pasó relativamente desapercibida hasta que dos años más tarde Félix D'Herelle resumió sus propias investigaciones y las de otros como Twort, J. Bodet y A. Gratia quienes hicieron sus primeros aportes al estudio de los bacteriófagos. D'Herelle describió el ciclo biológico de un bacteriófago en forma bastante aproximada considerando que por entonces no se contaba con técnicas de microscopía electrónica, centrifugación analítica, isótopos radiactivos, etc.

Fue en esa época que la esperanza puesta en los fagos como posibles agentes antibacterianos estimuló su investigación. Sin embargo en la década del 30 al 40 estas expectativas parecieron frustrarse debido principalmente a la alta frecuencia de aparición de bacterias resistentes; lo que provocó que los trabajos sobre bacteriófagos cesaran casi por completo en la literatura científica.

En la década del 40 Alfred Hershey, Salvador Luria y Max Delbruck advirtieron que los bacteriófagos podían servir como modelos para el estudio de problemas biológicos básicos, lo cual llevó al renacimiento del estudio de estos virus. Sus trabajos sentaron las bases para el surgimiento de la biología molecular y los hizo acreedores del Premio Nobel otorgado en 1969.

En las décadas siguientes los fagos fueron utilizados como modelos para el estudio de la replicación y organización del material genético, de las

mutaciones, del proceso la recombinación, del control molecular y síntesis de proteínas, de la morfogénesis viral, etc.

En la actualidad los fagos poseen un papel importante como herramientas de laboratorio, por ejemplo en bacteriología, son usados para la identificación de cepas bacterianas, en especial dentro de los géneros *Staphylococcus* y *Salmonella* en los cuales se han aislado un gran número de fagos especie específicos. En biología molecular los fagos son utilizados como vectores de clonado, ya sea para expresión de genes o para análisis genéticos, entre estos podemos citar el fago Lambda, M13, ϕ X174, f1, etc.

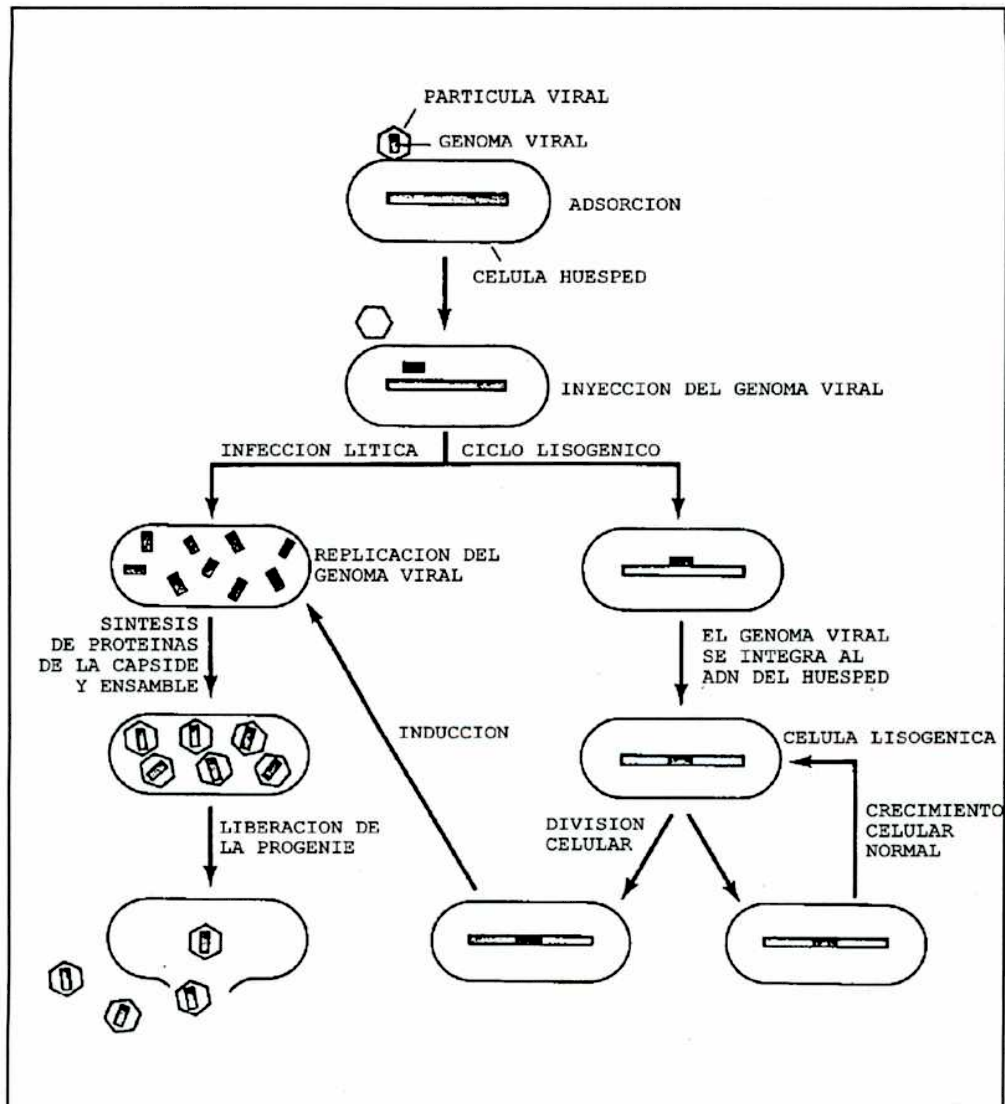
Ciclo biológico de un bacteriófago

D'Herelle dividió el proceso de infección de una célula bacteriana por un bacteriófago en los siguientes pasos:

- 1) Adsorción de la partícula viral a la célula huésped.
- 2) Penetración de componentes de la partícula viral (generalmente su material genético) hacia el citoplasma bacteriano.
- 3) Multiplicación intracelular del virus.
- 4) Liberación de la progenie viral.

Estos pasos corresponderían a lo que comúnmente se denomina un ciclo productivo (figura 1).

Figura N° 1: Esquema del ciclo biológico de un bacteriófago.



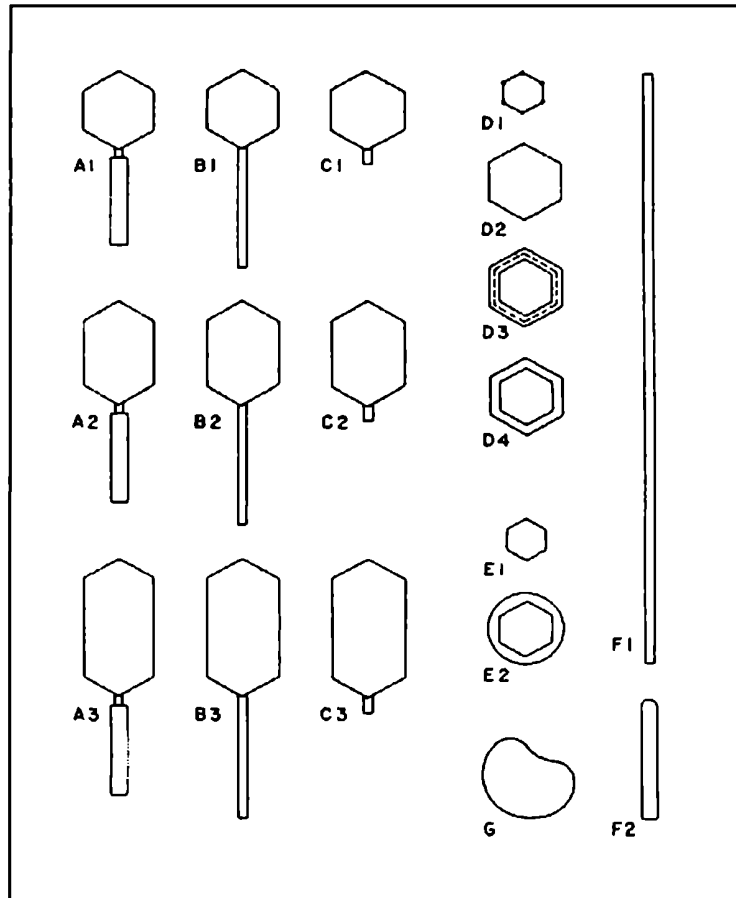
Hay sin embargo algunos fagos que no siempre se multiplican en la bacteria huésped, sino que en determinadas condiciones su ácido nucleico en lugar de iniciar el proceso de síntesis que lleva a la producción de más virus, se integra y duplica en sincronía con el cromosoma bacteriano. El genoma viral en este estado se denomina profago y las células que lo contienen bacterias lisogénicas. El profago puede espontáneamente o por inducción con diversos agentes iniciar un ciclo lítico con la consiguiente producción de partículas virales. Los fagos que poseen ciclos líticos y lisogénicos se denominan temperados.

Morfología y clasificación

Los bacteriófagos cuyos componentes son principalmente proteínas y ácidos nucleicos (ADN o ARN) son un grupo de entidades muy diverso ya que cubren un amplio rango de tamaños y morfologías.

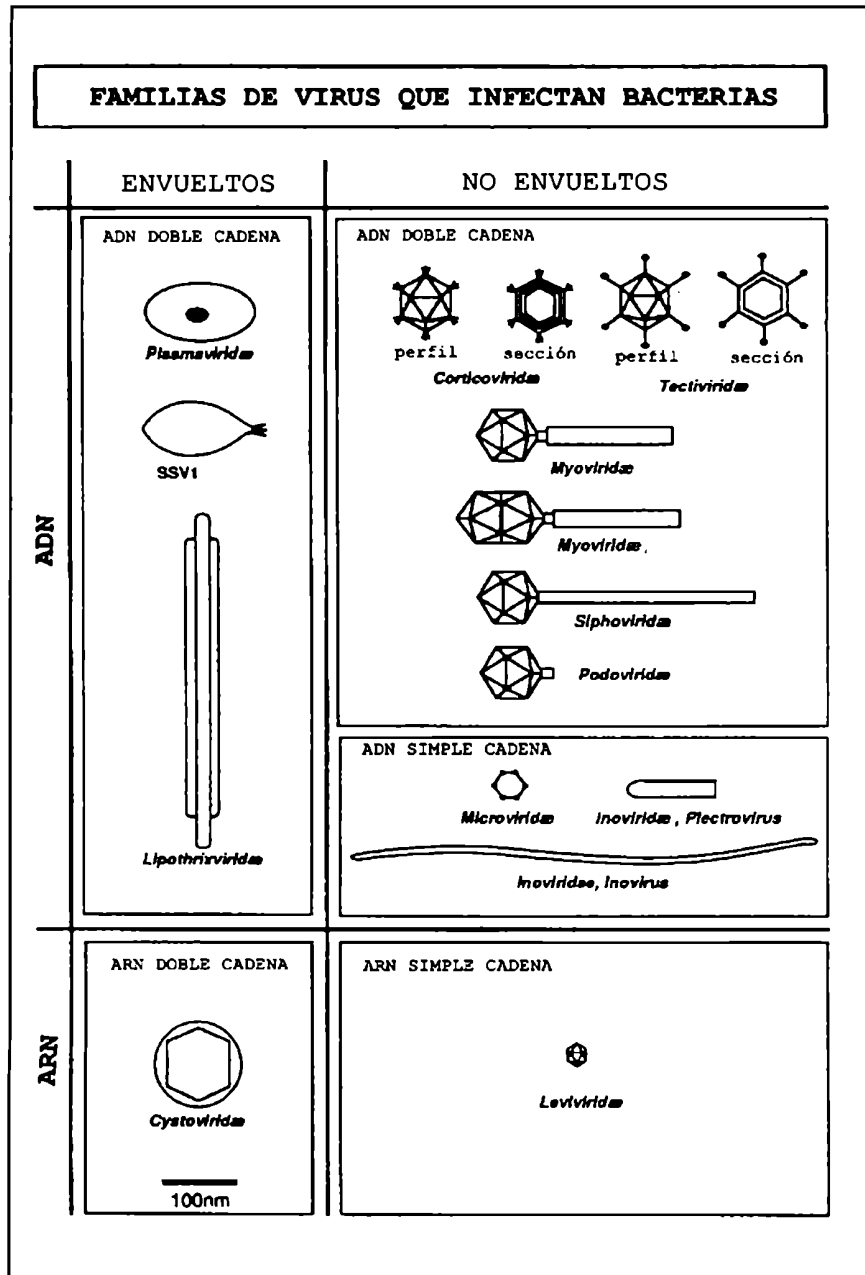
Un primer esquema de clasificación hecho por Bradley en 1967 teniendo en cuenta la morfología y el tipo de ácido nucleico, agrupó los bacteriófagos en seis morfotipos básicos denominados de la A a la F. La clasificación fue luego extendida con la descripción de nuevos fagos (Ackermann & Einsenstark, 1974). Esta clasificación incluyó una nueva subdivisión de bacteriófagos con cola de acuerdo al largo de su cabeza (figura 2).

Figura N° 2: Esquema de la clasificación de fagos en morfotipos



Actualmente el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) reconoció en base a la morfología y el tipo de ácido nucleico 12 familias de bacteriófagos (figura 3) (Francki et al, 1991).

Figura N° 3: Clasificación actual de los bacteriófagos.



Otros parámetros tales como serología, hibridación ADN-ADN, secuencia de ácidos nucleicos, patrones de proteínas, etc, permiten la definición de géneros o grupos relacionados y la distinción entre especies. La clasificación de los virus en familias, géneros y especies responde más a un problema de tradición que a una definición ajustada de dichos grupos de acuerdo a las categorías Linneanas clásicas.

La regla número 10 del ICTV dice que una especie esta representada por un grupo de cepas de una variedad de fuentes o bien poblaciones de cepas de una fuente en particular las cuales poseen un número de propiedades definidas que permiten establecer un patrón que difiere de otro grupo de cepas. Esta regla resulta de fácil aplicación cuando existen características especiales tales como el contenido de lípidos, bases inusuales, o bien cuando se trata de fagos con morfología cúbica filamentosa o pleomórfica.

En los bacteriófagos con cola la clasificación dentro de una especie requiere de estudios más exhaustivos. Sin embargo a pesar que solo el 50 % de los aislamientos de fagos con cola se encuentran feicientemente clasificados, se han podido definir más de 100 especies, lo cual sumado a la ubicuidad de los fagos en cuanto a sus huéspedes se refiere, refleja una extrema diversificación de estos virus que probablemente responde a una larga historia evolutiva.

Algunas dificultades surgen en cuanto a la definición de género, tales como el gran número de aislamientos, la poca disponibilidad de datos para algunos fagos, o bien los datos que existen son irrelevantes o no están bien definidos; además en algunos casos los criterios de selección de parámetros del fago a estudiar no permiten realizar un análisis comparativo o no hay uniformidad entre la metodología usada para definir un mismo parámetro.

Debido a esto la regla número 17 del ICTV, en forma amplia define el género como un grupo de especies con ciertos caracteres comunes.

Es por lo tanto importante tener en cuenta la jerarquía que se le da a los distintos parámetros de estudio para que puedan ser usados como criterios de clasificación. Ackermann et al, (1978) y el Subcomité de Virus Bacterianos del ICTV sugieren una jerarquía tentativa que agrupa parámetros de alto, medio y bajo nivel. Los parámetros de alto nivel deben ser determinados precisamente e inequívocamente ya que permiten la diferenciación entre fagos, estos parámetros incluyen: morfología del virion, tipo de ácido nucleico, densidad de flotación y composición de la partícula. Los parámetros de nivel medio son aquellos que pueden ser relevantes para un grupo de fagos y no para otros, tales como: presencia de fibras y/o placas basales, composición de bases o presencia de bases poco comunes en el ácido nucleico, presencia de azúcares y/o lípidos, número y composición de proteínas, datos serológicos y/o de hibridación ADN-ADN, rango de huésped, inactivación por agentes físicos y químicos y ciertas propiedades genéticas como por ejemplo la habilidad de transducción. Los parámetros de nivel bajo son aquellos que describen propiedades que dependen del huésped y/o de las condiciones de estudio, entre estos se pueden citar tamaño de placa de lisis, velocidad de adsorción, período de latencia, eficiencia de plaqueo, etc.

Siguiendo estos criterios se ha estudiado el bacteriófago aquí presentado. Este posee características morfológicas típicas de la familia *Podoviridae* (cola corta, ADN doble cadena lineal) las cuales sumadas al análisis de proteínas y secuencia del genoma viral permiten relacionar filogenéticamente a este bacteriófago con el colifago T7, y agruparlo junto con otros fagos con características morfológicas y de replicación semejantes a T7,

en el "Grupo T7" definido por Hausmann (ver más adelante), cuyo prototipo es el bacteriófago T7 dado que, dentro de este grupo, es el más estudiado hasta el momento.

En este trabajo se hará referencia en varias oportunidades al bacteriófago T7 como prototipo y al "Grupo T7", es por ello que en las páginas siguientes se presentan brevemente algunas de sus características más relevantes.

Características generales del bacteriófago T7

T7 es un fago cuyo huésped natural es *Escherichia coli* aunque también es capaz de replicar en algunas cepas de los géneros *Yersinia* y *Shigella*. Este bacteriófago posee un ciclo típicamente productivo, durante el cual se produce la ruptura del genoma de la célula huésped y el ADN viral se replica formando concatenados. Las partículas virales son icosaédricas de 60 nanómetros de diámetro y poseen una cola corta no contráctil de 20 nanómetros. La densidad de flotación es de 1,51 g/cm³ y están compuestas por 50 % de ADN y 50 % de proteínas. El genoma es ADN de cadena doble, lineal, de 40 kilopares de bases con redundancia terminal no permutada. Presenta alrededor de 12 proteínas distintas en su cápside y la infectividad es eter y cloroformo resistente.

Características del mapa genético de T7 y de su estrategia de replicación

El genoma de bacteriófago T7, que se encuentra completamente secuenciado, posee 39.936 pares de bases que codifican para 50 genes, e incluye regiones no codificantes (8 % del genoma) tales como extremos repetidos y señales que regulan la replicación y expresión de los genes (promotores, terminadores, secuencias de reconocimiento para la RNAasa III, origen de replicación, etc.) (Dunn & Studier, 1983).

El esquema de la figura 4 muestra el mapa genético de T7. El número de genes fue asignado en orden creciente respecto del origen de transcripción. Subsecuentes descubrimientos de otros genes intercalados entre los originalmente descritos obligó a numerarlos con notación decimal para no modificar los ya denominados. Los números romanos I, II y III indican las regiones del mapa según el orden en que se transcriben.

Los genes de la región I en el extremo izquierdo del genoma son transcritos por la ARN polimerasa del huésped y codifican para proteínas que redirigen el metabolismo celular hacia la replicación del fago.

Una ARN polimerasa codificada por el genoma viral transcribe los genes de la región II y III. Los genes de la región II están involucrados en la replicación del ADN viral, y los genes de la región III codifican para proteínas que intervienen en el proceso de morfogénesis viral.

La figura 5 muestra los sitios de regulación de la expresión de los genes de T7. Durante la infección la ARN polimerasa del huésped reconoce uno de los tres promotores (A1, A2 y A3) localizados cerca del extremo izquierdo del genoma (el primero en entrar a la célula huésped), y transcribe los genes de la región I hasta un sitio de terminación (TE) Rho dependiente. El mensajero

policistrónico de esta "región temprana" es procesado (sitios R) por la RNAsa III. Entre los mensajeros resultantes se encuentra el correspondiente a la ARN polimerasa del fago, el mensajero del gen 0,3 que codifica para una proteína que neutraliza la acción de las endonucleasas de restricción Eco B y Eco K del huésped manteniendo así la integridad del genoma viral y el mensajero del gen 0,7 cuyo producto es una proteína quinasa que inactiva a la ARN polimerasa del huésped.

Los genes de la región II son los responsables del metabolismo del ADN del fago. Los productos de estos genes son:

1. La ADN polimerasa, producto del gen 5, que posee además, una actividad de 3' a 5' exonucleasa. Esta proteína forma un complejo con la tiorredoxina del huésped para dar una forma altamente eficiente de polimerasa que replica el ADN de T7.

2. La helicasa y la primasa codificadas por el gen 4, que codifica dos proteínas de diferente peso molecular (63 y 56 kilodaltons).

3. Una proteína inhibidora de la ARN polimerasa del huésped que actúa por unión a esta enzima. Esta proteína es el producto del gen 2 y junto con la proteína quinasa producto del gen 0,7 son responsables del "shutoff" de la síntesis de proteínas del huésped.

4. Una proteína de unión a ADN simple cadena, producto del gen 2,5, la cual estimula la actividad de la ARN polimerasa sobre templados de simple cadena.

- 5 y 6. Una exonucleasa y una endonucleasa, productos de los genes 6 y 3 respectivamente, que actúan degradando el ADN de la célula huésped en nucleótidos ácido solubles que servirán como sustrato de la ADN polimerasa de T7.

Los genes de la región III son al igual que los de la región II transcritos por la ARN polimerasa de T7 y constituyen en su mayoría los que codifican para las proteínas de la partícula viral. En esta región también se encuentran el gen 9 que codifica para una proteína de ensamblaje, y los genes 18 y 19 que codifican para proteínas esenciales para el empaquetamiento del ADN del fago.

Figura N° 4: Mapa genético del fago T7.

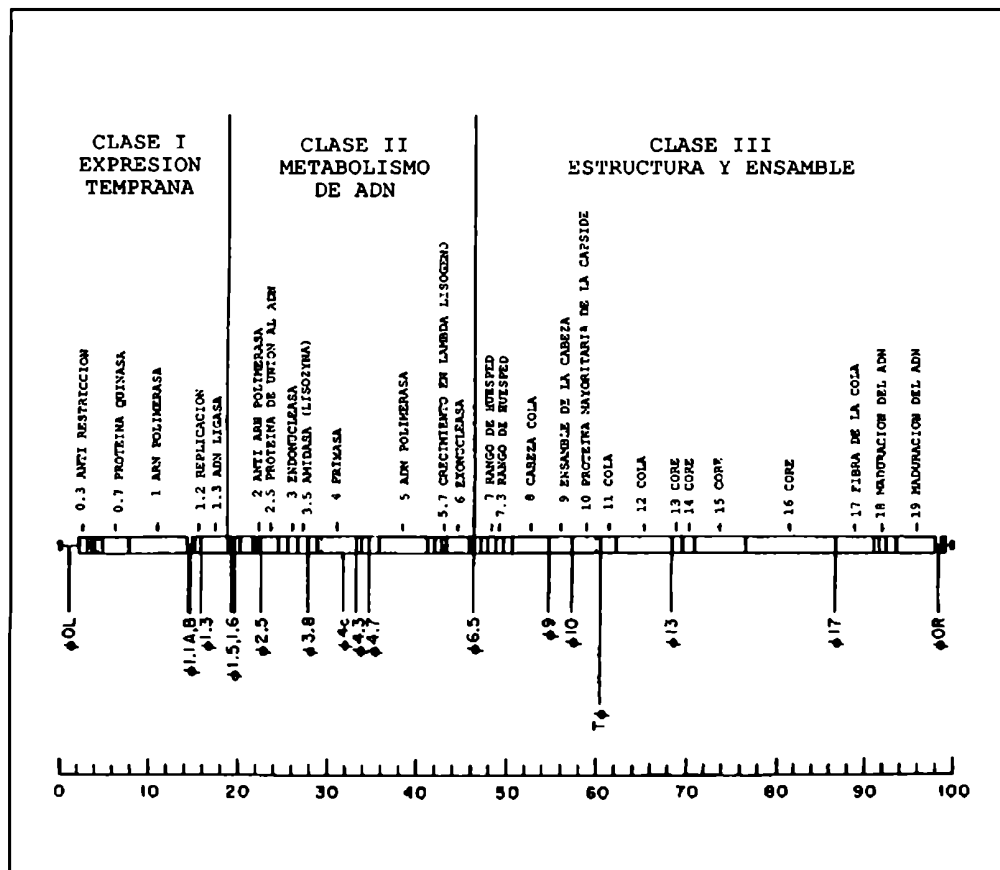
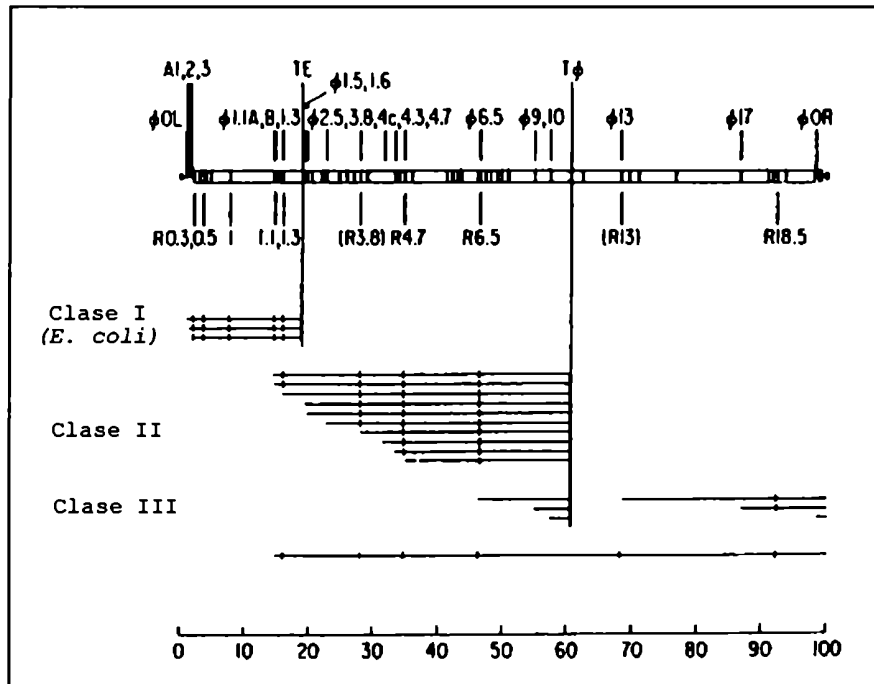


Figura N° 5: Expresión del genoma de T7.



Los promotores para la ARN polimerasa de T7 están indicados como ϕ .

ϕ OL y ϕ OR son promotores de orígenes secundarios de replicación.

T ϕ representan los sitios de terminación.

A1, A2 y A3 son promotores para la ARN polimerasa de *E. coli* y TE el sitio de terminación para esta enzima.

Los sitios de clivaje de la RNAsa III se indican como R.

Las líneas horizontales representan los transcritos primarios individuales con sus sitios de procesamiento.

"Grupo T7"

El "Grupo T7" denominado así por Hausmann, (1988), agrupa bacteriófagos relacionados filogenéticamente con el fago T7. El grupo puede dividirse en subgrupos según el grado de relación y según el rango de huésped:

A. Bacteriófagos filogenéticamente relacionados con T7 que replican en *Escherichia coli* B.

Tres grupos de bacteriófagos filogenéticamente relacionados con T7 fueron distinguidos en base a estudios comparativos realizados por diferentes autores.

1. Grupo del bacteriófago T3.

Este grupo contiene solamente un miembro que pertenece a la serie de fagos T, el fago T3. La relación de este fago con T7 fue originalmente establecida en base a las similitudes morfológicas y a su reacción serológica cruzada, aunque la velocidad de inactivación de T3 con antisuero anti-T7 fue solamente un 10 % de la velocidad de inactivación homóloga (T7 vs antisuero anti-T7) (Adams y Wade, 1954). Posteriormente la relación entre estos fagos fue confirmada al observarse recombinación genética entre ellos (Hausmann, 1961), aunque las tasas de recombinación de los cruzamientos T3 x T7 eran varios órdenes de magnitud menores que los cruzamientos homólogos (Beier y Hausmann, 1973-1974).

Estudios comparativos mediante análisis detallado de microscopía electrónica de heteroduplex de ADN de estos fagos reveló que existe una extensa relación de homología la cual está particularmente acentuada en los

genes 15, 16 y 17 y en un segmento correspondiente al gen 1 donde la homología fue estimada en un 80 % (David & Hyman, 1971), valor que fue luego corroborado al comparar la secuencia nucleotídica de este gen (McGraw et al, 1985; Moffatt et al, 1984). El análisis de heteroduplex también indicó que no parece existir homología extensa entre los extremos repetidos de T3 y T7. Dietz et al en 1985 realizaron un análisis teórico de la evolución de esta región en T7, T3 y el fago K11 de *Klebsiella* a partir del análisis de su secuencia nucleotídica.

2. Otro fagos relacionados con T7.

Hausmann (1988) estudió más de 50 aislamientos de fagos relacionados con T7 realizados en aguas de Freiburg o del río Rin en Colonia y los distinguió mediante el patrón de restricción que presentaba cada fago cuando su genoma era digerido con HpaI tal como lo había sugerido Studier en 1979 para este tipo de fagos. Hausmann mostró que a pesar de tener claras diferencias en el patrón de restricción estos fagos estaban más relacionados a T7 que a T3 dado que 1) cruzamientos con mutantes ámbar mostraban recombinación genética con T7 y no con T3, 2) las ARN polimerasas de estos fagos tenía la misma especificidad de templado que la ARN polimerasa de T7, 3) daban infecciones abortivas en *Shigella sonnei* D₂ 371-48 como T7, T3 replica normalmente en esta bacteria y 4) el patrón de proteínas intracelulares de células infectadas era similar al patrón de proteínas de células infectadas con T7.

3. Bacteriófagos BA14, BA127 y BA156.

Estos fagos se clasifican en un grupo aparte dado que a diferencia del

grupo anterior no recombinan con T7 ni con T3 (pero si entre ellos) y sus ARN polimerasas poseen la misma especificidad de templado pero todas ellas son incapaces de transcribir ADN de T3 y de T7. Sin embargo a semejanza de T3 y a diferencia de T7 poseen un gen que codifica para la enzima S adenosil metionina hidrolasa.

B. Bacteriófagos relacionados con T7 que replican en cepas de *E. coli*, distintas a *E. coli* B o K12.

Dos grupos han surgido de los pocos aislamientos que se han realizados de fagos relacionados con T7 que pueden infectar otras cepas de *E. coli* distintas de B o K12.

Estos dos grupos pueden ser distinguidos en base a las diferencias de especificidad de templado de sus ARN polimerasas. Uno de los grupos está conformado por los fagos A16 y CK235 y el otro por los fagos K31 y ϕ 1.2. Las ARN polimerasas de los miembros de cada grupo transcriben ADN de los fagos del mismo grupo y no del otro, y ninguna de estas ARN polimerasas transcriben ADN de T3 o de T7. Además existen algunas diferencias en los pesos moleculares de las proteínas intracelulares de células infectadas con estos fagos en comparación con el patrón de proteínas observado en células infectadas con T7.

Es importante destacar el hecho que A16 y ϕ 1.2 que pertenecen a distintos grupos replican en el mismo huésped.

C. Bacteriófagos relacionados con T7 y/o T3 de enterobacterias distintas a *E. coli*.

Entre los géneros de enterobacterias en los cuales se han descrito fagos con características similares a T7 y/o T3 se encuentran:

Cepa	Fago	Referencia
<i>Serratia marcescens</i>	IV	Wassermann & Seligmann, 1953
<i>Citrobacter sp</i> C123	ViIII	Kwiatkowsky et al, 1975
<i>Klebsiella sp</i> 390	K11	Korsten et al, 1979
<i>Salmonella typhimurium</i>	SP6	Kassavetis et al, 1982
<i>Kluyvera sp</i> 21	Kvp1	Aquí descrito

Los análisis realizados para caracterizar estos fagos incluyen microscopía electrónica, caracterización físico-química, estudios de transcripción heteróloga de ARN polimerasas virales, hibridación ADN-ADN, perfil de proteínas intracelulares de células infectadas, etc. Estos estudios permiten evidenciar algunas relaciones filogenéticas, sin embargo solo aquellos que incluyen un análisis comparativo de la secuencia de sus genomas indican con certeza un origen común. Es el caso del fago SP6 (Kotani et al, 1987), K11 (Dietz et al, 1985) y el fago aquí descrito, además de los fagos T3 y T7 tomados como referencias. Para el resto de los fagos mencionados no hay aún disponible datos de secuencias que permitan un estudio comparativo.

D. Bacteriófagos relacionados con T7 cuyos huéspedes no son enterobacterias.

Dentro de este grupo encontramos el fago gh-1 de *Pseudomonas pútida*

que codifica para una ARN polimerasa con especificidad para su propio templado. El patrón de proteínas de células infectadas y de la partícula viral son similares a los observados para el caso de T7 (Towle, 1975). Sin embargo el ADN de gh-1 no hibrida con el ADN de T3 ni de T7. También se aisló un fago que infecta específicamente una cepa rugosa de *Pseudomonas aeruginosa* denominado ϕ PLS27 con características similares a T7 y cuyos extremos del genoma presentan redundancia terminal.

Otro fago morfológicamente similar a T7, es el fago ϕ Cdl de *Caulobacter crescentus* que también codifica una ARN polimerasa resistente a rifampicina responsable de la transcripción de los genes tardíos (West et al, 1976).

Una cianobacteria, *Plectonema boryanum* sirve como huésped de un fago denominado LPP-1 que presenta similitudes morfológicas y un patrón de proteínas intracelulares en células infectadas similar a T7 (Sherman & Haselkorn, 1970).

Familia *Podoviridae* y el "Grupo T7".

La suma de observaciones realizada por distintos autores y las aquí presentadas muestran que las características morfológicas y físico-químicas junto con la estrategia de infección del fago T7 son encontradas en un gran número de fagos que infectan bacterias pertenecientes a distintos taxones.

Todos estos fagos poseen una cabeza icosaédrica de aproximadamente 60 nanómetros, con una cola corta no contráctil de aproximadamente 15 nanómetros características comunes de la familia *Podoviridae*. Es de tener en

cuenta que todos los fagos relacionados con T7 pertenecen a esta familia pero que la inversa no es cierta ya que en esta encontramos fagos con estructura genómica y estrategias de infección diferentes a las del bacteriófago T7 como por ejemplo el fago P22 de *Salmonella typhimurium*, el colifago N4 o el fago PX3 de *Pseudomonas*. Docenas de géneros tan variados como *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Brucella*, *Hydrogenomonas*, *Proteus*, *Rhizobium* y *Vibrio* poseen fagos pertenecientes a la familia *Podoviridae* que no han sido estudiados suficientemente como para incluirlos o excluirlos del grupo de fagos relacionados a T7.

Sobre el origen y evolución del "Grupo T7"

Si bien se han aislado en distintas regiones del globo diferentes fagos relacionados con T7, nada se puede decir sobre las relaciones evolutivas de estos fagos, especialmente porque la mayoría de los aislamientos responden a intereses propios de cada investigador y no a análisis diseñados para realizar estudios filogenéticos.

En uno de los pocos estudios realizados, Hausmann definió dentro del "Grupo T7" a un subgrupo de fagos muy relacionados con T7 que replican en *E. coli B* como "el super clon T7". Estos fagos poseen una compatibilidad genética que permite el cruzamiento entre sus miembros. Dentro de este subgrupo se incluye el fago T3 y los fagos ϕ I, ϕ II, W31 y H de *Pasteurella* (Hyman et al, 1974). Todos ellos son distinguibles por muy escasas diferencias en los patrones de proteínas intracelulares en células infectadas y en los patrones de restricción de sus genomas con la enzima HpaI.

Es posible que el ancestro común de todos los bacteriófagos morfológica y genéticamente relacionados con el fago T7 haya tenido como huésped al ancestro común de todas las bacterias que han sido reconocidas como huéspedes de los fagos descritos dentro de este grupo y que las divergencias actualmente observables se deban, al menos en parte, a la divergencia común del huésped y el parásito que eventualmente puede llevar al aislamiento genético seguido de una rápida divergencia fenotípica. Sin embargo, existe divergencia aún en fagos que conservan el mismo huésped, aunque esa divergencia esta atenuada en gran parte mientras se conservan mecanismos de recombinación cruzada, es decir mientras los genomas sean suficientemente homólogos como el caso de los miembros del "super clon T7".

Las "huellas" de las relaciones filogenéticas de los actuales bacteriófagos están preservadas en la secuencia de sus genomas y solo en algunos casos estas relaciones pueden ser analizadas por comparaciones fenotípicas. Es por ello que estudios comparativos de distintas regiones del genoma de fagos relacionados o idealmente de todo el genoma, podría resultar en un cuadro detallado de los cambios genéticos ocurridos a lo largo de la evolución y posiblemente de las características del antecesor común.

Para ello, es necesario ampliar el rango de estudio de huéspedes y fagos respectivos dentro de un grupo determinado, reconocer los límites del grupo, establecer la evolución de distintos módulos del genoma.

Unos pocos estudios han sido dirigidos en este aspecto, por ejemplo, aquellos en los cuales se ha secuenciado el gen de la ARN polimerasa viral, una enzima clave en el proceso de replicación del virus que existe en todos los fagos relacionados con T7 descritos hasta el momento. Este tipo de análisis permitiría la construcción del árbol genealógico que marcará los eventos

macroevolutivos substanciales en cuanto a la evolución de este grupo. Los resultados presentados en esta tesis describiendo un nuevo bacteriófago de este grupo y su respectivo huésped incluyen este análisis y constituye una contribución al estudio de la evolución del grupo de bacteriófagos filogenéticamente relacionados al fago T7.

II. BACTERIAS DEL GENERO *KLUYVERA*

El género *Kluyvera* posee una historia turbulenta. En el año 1936 A.J. Kluyver y C.B. van Niel describieron un grupo de bacterias que presentaban flagelos polares y que fermentaban hidratos de carbono en forma análoga al género *Escherichia*. Teniendo en cuenta la disposición de sus flagelos estas bacterias fueron incluidas en la tribu *Pseudomonadaceae*.

En el año 1955 Asai aisló un grupo de cepas con flagelos polares que producían grandes cantidades de ácido alfa-cetoglutarico durante la fermentación de la glucosa.

Posteriormente, Asai y Okumura (1956) propusieron la denominación *Kluyvera* para este grupo de bacterias en homenaje a A.J. Kluyver por su contribución al entendimiento del metabolismo y fisiología microbiana. Dos especies fueron propuestas en base a la utilización de ácido cítrico como única fuente de carbono: *Kluyvera citrophila* y *Kluyvera noncitrophila*. El género *Kluyvera* fue incluido dentro de la tribu *Pseudomonadaceae* que en aquellos tiempos incluía además de microorganismos no fermentadores, también algunos fermentadores como el género *Aeromonas*. Hoy la familia *Pseudomonadaceae* solo agrupa bacterias que no fermentan glucosa.

En 1962 nuevamente Asai y colaboradores observaron que las cepas de *Kluyvera* descritas anteriormente poseían flagelos peritricos en lugar de polares y propusieron que el género se incorpore junto con especies del género *Escherichia* en la familia *Enterobacteriaceae*; así el género *Kluyvera* fue abolido en 1962 por sus propios creadores.

Fue recién en 1981 cuando Farmer y colaboradores analizando más de 100 cepas de origen clínico, redefinieron el género. Hasta ese entonces, las cepas que estos autores propusieron eran agrupadas en forma genérica como "Grupo entérico 8" o "API grupo 1" por Analytab Products Plainview, N.Y. ya que no podían identificarse como pertenecientes a algún género específico dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Los estudios realizados por Farmer et al en 1981 basados en reacciones bioquímicas, susceptibilidad a antibióticos e hibridaciones ADN-ADN permitieron que el género *Kluyvera* fuera aceptado como miembro de la familia *Enterobacteriaceae*.

Este nuevo género está compuesto por dos especies definidas: *Kluyvera ascorbata* y *Kluyvera criocrescens*, y un tercer grupo denominado "especies de *Kluyvera* grupo 3" aún no definido.

Actualmente la "Lista aprobada de denominaciones bacterianas" incluye a las dos especies de *Kluyvera* antes mencionadas. Los nombres de las especies *Kluyvera citrophila* y *Kluyvera noncitrophila* han sido reemplazados por *Kluyvera ascorbata* y *Kluyvera criocrescens* respectivamente.

Características del género *Kluyvera*

El género *Kluyvera* consta al igual que otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* de bacterias Gram negativas de forma cocobacilar de 0,5 a 0,7 μm por 2 a 3 μm , móviles por flagelos peritricos, anaeróbios facultativos. Catalasa positivos; que reducen nitratos a nitritos, producen ácido y gas de la fermentación de la glucosa y grandes cantidades de ácido alfa-cetoglutarico. La mayoría de los carbohidratos son fermentados pero no así, en general, los polihidroxi-alcoholes.

Casi todas las cepas son indol positivas y el citrato es generalmente utilizado como única fuente de carbono. Son rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer negativo (Holt, 1989). El contenido de G+C dentro del género es de 55-57 moles %.

La tabla 1 (ver en la sección de resultados) muestra las reacciones bioquímicas que caracterizan al género y la tabla 2 las reacciones bioquímicas que permiten diferenciar al género *Kluyvera* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Farmer et al, 1985).

La figura 6 describe las relaciones filogenéticas del género *Kluyvera* de acuerdo a la técnica de hibridación ADN-ADN, con otros géneros de enterobacterias. En base a estos datos las especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* son los más relacionados (Farmer et al, 1981).

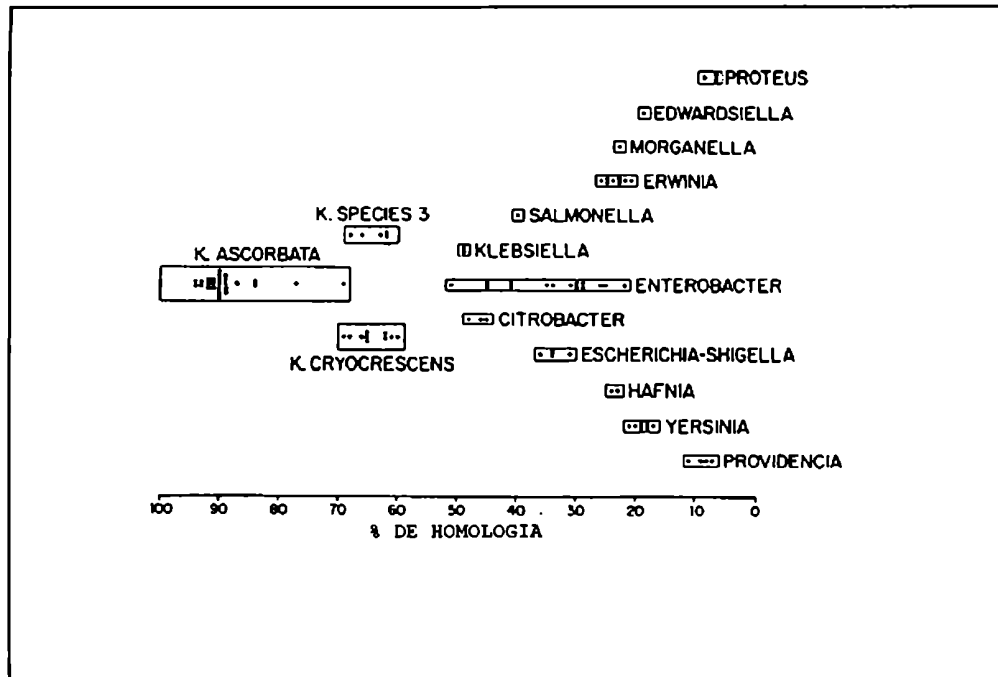
Las dos especies del género pueden ser diferenciadas por simples ensayos. *Kluyvera ascorbata* utiliza el ácido ascórbico como única fuente de carbono, mientras que *Kluyvera criocrescens* puede crecer en un medio con D-glucosa como única fuente de carbono a 5 °C al cabo de 21 días de incubación.

Tabla N° 2: Diferenciación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, indol positivo, Voges-Proskauer negativo. 1: *Escherichia coli*, 2: *Citrobacter diversus*, 3: *Citrobacter amalonaticus*, 4: *Kluyvera*, 5: *Enterobacter agglomerans* biogrupo G3 y 6: *Enterobacter agglomerans* biogrupo 5.

Test	1	2	3	4	5	6
Utilización del Citrato (Simmons)	-	+	+	+	+	+
Lisina decarboxilasa (Moeller)	+	-	-	+	-	-
Arginina dihidrolasa (Moeller)	-	-	-	-	-	-
Ornitina decarboxilasa (Moeller)	V	+	+	+	-	-
Crecimiento en KCN	-	-	+	+	+	V
Utilización del malonato	-	+	-	+	+	V
Pigmento amarillo	-	-	-	-	+	+
β -xilosidasa	-	-	-	+	V	V
β -glucuronidasa	+	-	-	-	-	-
Tetrionato reductasa	-	-	+	-	-	V
Producción de gas a partir de D-glucosa	+	+	+	+	+	-
Producción de ácido a partir de:						
Lactosa	+	-	-	+	V	-
Adonitol	-	+	-	-	-	-
L-sorbosa	-	-	+	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	V	V	V
Dulcitol	V	V	-	V	V	V
Sacarosa	V	V	-	+	-	-
Rafinosa	-	-	-	+	-	-
Salicina	V	-	-	+	V	V
Melibiosa	+	-	-	+	+	V

V: Variable.

Figura N° 6: Porcentaje de homología del ADN de distintos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* con ADN de *K. ascorbata* ATCC 14236 basado en el porcentaje de reasociación a 60°C.



La tabla 3 (ver en la sección de resultados) muestra los resultados de las reacciones bioquímicas que permiten distinguir a estas dos especies.

Las cepas analizadas hasta el momento de "especies de *Kluyvera* grupo 3" poseen características bioquímicas e hibridación ADN-ADN distintos a las especies antes mencionadas; posiblemente representen otras especies de *Kluyvera* para las cuales la asignación de un nombre científico requiere de más estudios y más aislamientos (Farmer et al, 1981).

Ecología y significancia clínica

Casi no existen referencias que analicen la ecología de los miembros del género *Kluyvera*, la mayoría de los trabajos solo se refieren a su importancia clínica en relación al origen del aislamiento. Con respecto a esto último se encontró que el tracto respiratorio parece ser la fuente más común de cepas del género *Kluyvera* sin embargo en esta localización no parecen tener importancia clínica. El tracto urinario es la segunda fuente más común, pero tanto la cantidad de microorganismos encontrados como la cantidad de células sanguíneas acompañantes fue demasiado baja como para indicar una infección. También en materia fecal y en alimentos se han aislado cepas de este género.

Cinco aislamientos se han descrito a partir de sangre de pacientes, los cuales incluyen cepas de *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera criocrescens* y "especies de *Kluyvera* grupo 3" pero dichos reportes no mencionan su significación clínica (Wong, 1987; Tristram & Forbes, 1988). Un aislamiento que fue considerado clínicamente significativo, fue obtenido del fluido de drenaje de la vesícula biliar de una mujer de 65 años con pancreatitis aguda (Jogev & Kosloswski, 1990).

Miembros de ambas especies y principalmente de *Kluyvera criocrescens* fueron aisladas del medio ambiente (suelo, agua, efluentes cloacales).

En nuestro país se han descrito aislamientos de *Kluyvera ascorbata* a partir de muestras de bilis obtenida por vía quirúrgica y orina, ambos resultaron ser cultivos monomicrobianos y provenientes de pacientes con marcada reacción inflamatoria (Vay et al, 1993).

Braunstein et al, (1980) han sugerido que *Kluyvera* es algo más que un saprófito benigno y como la mayoría de las especies de la familia

Enterobacteriaceae pueden ser considerada como un patógeno oportunista infrecuente.

Susceptibilidad a antibióticos

Kluyvera sp es sensible a la mayoría de los antibióticos. Analizando la susceptibilidad a distintos antibióticos, por el método de Bauer & Kirby, (1966) se observó que los miembros de la especie *Kluyvera cryocrescens* presentan halos de inhibición en general, mayores de 17 mm de diámetro, alrededor de discos con 100 μ g de carbenicilina y de discos con 30 μ g de cefalotina; mientras que para los mismos antibióticos los integrantes de la especie *Kluyvera ascorbata* muestran halos de inhibición pequeños, en general menores de 17 mm de diámetro. Este hecho constituye un elemento más para la diferenciación de especies junto con las pruebas bioquímicas antes mencionadas.

Otras características

De acuerdo a los métodos estándar para la examinación microbiológica de aguas, *Kluyvera sp* puede ser considerada una bacteria coliforme, dado que posee las características de esta categoría, como la capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas; pero no es considerada una coliforme fecal ya que no crece a 42 °C.

En placas con agar triptona de soya incubadas por varias semanas a

temperatura ambiente se observaron cristales azules y rojos en las colonias y en los alrededores de estas. Aunque la naturaleza de estos cristales no ha sido determinada, Farmer et al, (1981), propusieron para la sustancia que los compone el nombre de kluveramicina.

De lo expuesto queda claro que el género *Kluyvera* necesita, para su correcta definición y descripción, la realización de numerosos estudios sistemáticos y fisiológicos. En este trabajo se describe el aislamiento de una cepa bacteriana de este género y se analizan algunas de sus propiedades generales. También como se mencionó anteriormente se ha aislado un bacteriófago que como se vera en los resultados presenta una selectividad muy marcada (sino absoluta) por células pertenecientes a este aislamiento de *Kluyvera*.

MATERIALES Y METODOS

I. AISLAMIENTO DEL BACTERIOFAGO Y SU HUESPED

Para el aislamiento de fagos en general y de sus huéspedes respectivos presentes en el Riachuelo se tomaron muestras de agua de distintas estaciones de muestreo (E1, E2 y E3; ver el mapa de la figura 8 en la sección de resultados). Un trozo de gasa estéril atada a un hilo del cual pendía una plomada se arrojó al río y luego se colectó el agua embebida en la gasa en un recipiente estéril. Una parte del volumen del agua escurrida de la gasa se utilizó para realizar un recuento de bacterias aerobias totales en agar Luria-Bertani (agar LB: 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl y 15 g/l de agar; pH 7,5) incubando a 30 °C. De las placas con agar LB que contenían colonias aisladas se tomaron igual número de colonias grandes, medianas y pequeñas al azar, antes que fuera observable algún otro tipo de diferenciación morfológica entre las colonias. Las cepas aisladas fueron purificadas por repiques sucesivos, teñidas mediante la coloración de Gram y observadas al microscopio óptico.

Todos los aislamientos se conservaron en caldo LB con glicerol 20 % a -20 °C y en agar LB punción a 4 °C para analizar luego su susceptibilidad a fagos o para realizar otros estudios.

Por otro lado el resto del agua colectada de las distintas estaciones de muestreo se centrifugó dos veces a 10.000g (centrífuga BECKMAN JA 21, rotor JA 14 o JA 20) durante 30 minutos a 4 °C para eliminar bacterias y partículas disueltas en el agua. Para el aislamiento de bacteriófagos, 0,1 ml de agua centrifugada se mezcló con 0,1 ml de un cultivo en fase exponencial de cada uno de los aislamientos bacterianos en 3 ml de agar LB blando (caldo LB con 7 g/l de agar) a 45 °C y la mezcla se volcó rápidamente en placas de Petri

conteniendo agar LB solidificado. Luego de 24 a 48 horas de incubación a 32 °C se observó desarrollo de placas de lisis sobre los distintos aislamientos.

II. EL HUESPED

Caracterización bioquímica del huésped

Se utilizaron dos métodos para la identificación de los aislamientos bacterianos mediante pruebas bioquímicas: 1) Pruebas bioquímicas clásicas ampliamente detalladas en el Manual de Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica (Mac Faddin, 1980) y en Identification of *Enterobacteriaceae* (Edwards & Ewing, 1972) y otras pruebas especiales cuya descripción se detallan más adelante. 2) Sistemas multitest de pruebas bioquímicas API 20E para enterobacterias y otros Gram negativos y API Rapid NFT para Gram negativos no fermentadores.

Test de ascorbato (Farmer et al,1981)

Como se mencionó en la introducción este test permite diferenciar las dos especies definidas de *Kluyvera* mediante la observación del crecimiento con producción de ácido y gas en medio ascorbato el cual contiene: 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl (todos estos Gibco o Merck), 10 g de L-ascorbato de sodio (Sigma) y 0,004 g de azul de bromotimol (Difco), por litro, disueltos en agua destilada ajustando el pH a 7,5

con NaOH 1 N; a este pH el medio es de color azul. Este medio es fraccionado en tubos de ensayo con campanita de Durham y tapa plástica y autoclavado, luego se le agrega a cada tubo 1 ml de aceite mineral estéril y se inocula con la cepa a analizar.

Luego de 48 horas de incubación a 37°C se considera positivo si se observa crecimiento con producción de ácido (viraje del indicador a amarillo) y presencia de gas dentro de la campanita de Durham.

Test de fermentación de glucosa a 5 °C

Este test se realiza utilizando el mismo medio de cultivo que para el test de ascorbato, en el cual el L-ascorbato de sodio es reemplazado por 10 g de glucosa (Sigma) por litro; se incuba la cepa a analizar (sin el agregado del aceite mineral) a 5 °C durante 21 días. Se considera resultado positivo cuando transcurrido ese lapso de tiempo se observa crecimiento y producción de ácido por fermentación de la glucosa (viraje del indicador a amarillo).

Curva de crecimiento

Una dilución 1 en 100 de un cultivo de 18 horas de incubación de la cepa 21 se sembró en caldo LB y se incubó a 30 °C con una agitación de 120 rpm. A distintos tiempos durante la incubación se tomaron alícuotas en las cuales se midió la densidad óptica a 600 nm y se realizó una tinción de Gram. También se determinó mediante recuento en placa las UFC/ml en algunas

alícuotas para determinar la constante de crecimiento a 30 °C en caldo LB expresada en número de duplicaciones por unidad de tiempo.

Sensibilidad a antibióticos y metales pesados

La sensibilidad a antibióticos se determinó por el método de Bauer y Kirby, (1966) con multidiscos impregnados en distintos antibióticos. Se midieron las zonas de inhibición del crecimiento en agar Müller-Hinton y se interpretaron los resultados mediante una tabla de correlación entre el diámetro del halo de inhibición y la sensibilidad al antibiótico (sensible, intermedio o resistente).

La resistencia a metales pesados fue testada en agar LB, suplementado con distintas concentraciones de CdCl_2 , AgNO_3 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, HgCl y CuSO_4 , luego de 24 horas de incubación a 30°C se observó presencia o ausencia de desarrollo de los cultivos en placa.

Análisis de plásmidos

Se analizó la presencia de plásmidos mediante la técnica de extracción alcalina (Birboin & Doly, 1979) y electroforesis en geles de agarosa.

Susceptibilidad de la cepa 21 a otros fagos

Se determinó si la cepa podía ser infectadas productivamente por otros fagos, tales como T7, T2, T4, T6, Lambda, P1 y M13 de *E. coli* y K11 de *Klebsiella*; para ello se mezcló 0,1 ml de un cultivo exponencial de la cepa 21 con 0,1 ml de distintas diluciones de stocks de cada uno de los fagos en agar blando LB fundido y precalentado a 45 °C, se agregó Ca₂Cl hasta una concentración de 5 mM, se dejó adsorber 5 minutos a 37 °C y se volcó sobre una placa de agar LB solidificado. Luego de incubar durante 48 horas a 37 °C se observó presencia o ausencia de placas de lisis.

III. EL BACTERIOFAGO

Preparación de stocks de fagos

El fago se propagó según requerimiento en cultivos exponenciales del huésped (DO600nm: 0,5) en caldo LB a multiplicidad de infección 1 o 0,1 a 37 °C con agitación continua durante dos horas.

Las bacterias y debris celulares se separaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 μm de tamaño de poro (Sartorius). El título del stock se determinó en todos los casos por el método de Adams, (1959).

La preparación de stocks utilizando cultivos de bacterias en distintas etapas del crecimiento no modificó significativamente el título final de fagos

obtenidos. Sin embargo stocks preparados con cultivos exponenciales concentrados (más de 10^{10} UFC/ml), o bien cultivos estacionarios de más de 18 horas de incubación, resultaron en títulos finales considerablemente menores a los obtenidos normalmente.

Concentración de fagos

Los stocks de fagos se concentraron con 10 % de polietilenglicol 6000 (PEG) y 0,5 % de NaCl según el método de Yamamoto & Alberts, (1970). Luego de centrifugar durante 20 minutos a 10000 rpm, el pellet se resuspendió en un buffer conteniendo 0.1 M de NaCl, 0,01M de $MgSO_4$, 0,1 M de Tris-HCl pH 7 (buffer fago); el concentrado se trató con DNAsa I pancreática y RNAsa A pancreática (Sigma) en concentración 10 $\mu g/ml$ durante una hora a 37 °C.

Purificación de las partículas virales

Los stocks de fagos concentrados se purificaron en un gradiente isopícnico conteniendo 696 mg/ml de CICs (BRL); el gradiente fue formado por centrifugación a 23.000 rpm (en centrífuga Beckman L8-55, rotor SS55 Ti corresponde a 55.000g) durante 24 horas a 15 °C, luego se recolectaron 11 alícuotas las cuales se monitoriaron en cuanto a su índice de refracción y número de partículas infecciosas por ensayo de formación de placas. Las fracciones en las que se observó la mayor parte de las partículas infecciosas

fueron dializadas durante 48 horas a 4 °C con 6 cambios de buffer fago.

Se realizó un análisis de pureza de la fracción con mayor título observando el espectro de absorvancia a la luz UV tomando como criterio de pureza el indicado por Sinsheimer, (1959).

Curva de un solo ciclo

Un cultivo exponencial de 10^8 UFC/ml de la cepa huésped se infectó con un stock de fagos a multiplicidad de infección 1. Luego de 3 minutos de adsorción se diluyó el cultivo 100 veces para evitar posteriores adsorciones y a distintos tiempos se tomaron alícuotas que fueron ensayadas por formación de placas de lisis de acuerdo al método de Adams (1959).

Microscopía electrónica de transmisión

Tinción negativa

Una suspensión de fagos purificados dializados durante 48 hs en acetato de amonio 0,1 M, fue utilizada para observar la morfología de las partículas por microscopía electrónica de transmisión mediante tinción negativa.

El procedimiento para teñir consistió en mezclar sobre una grilla de cobre (400 mesh) para microscopía electrónica, previamente cubierta con una película soporte de FORM-VAR, una gota de la suspensión de fagos con una gota de una solución 2 % de fosfotugstato de potasio pH:7; luego de 20 a 30

segundos se absorbió el resto de la solución apoyando sobre el borde de la grilla una punta de papel de filtro, se secó y se cubrió con un película de carbón sublimado para preservarlas.

Preparación de cortes de bacterias infectadas

Para el estudio de los eventos que ocurren durante la replicación intracelular del fago se realizaron cortes ultrafinos de bacterias infectadas. Para ello un cultivo del huésped en fase de crecimiento exponencial se inoculó con fagos a una multiplicidad de infección de 10. Se tomaron muestras a distintos tiempos post-infección y las células se fijaron con 0,25 % de glutaraldehído y 4 % de paraformaldehído en buffer fosfato 0,2 M pH 7,4 durante 18 horas a 4 °C. Luego se centrifugaron y lavaron tres veces con buffer fosfato con 5 % de sacarosa para resuspenderlas en solución fijadora de tetróxido de ósmio 2 % en buffer fosfato pH 7,4. A continuación se pretiñeron el bloque con acetato de uranilo al 5 % durante toda la noche, se deshidrataron haciendo lavados con distintos porcentajes crecientes de alcohol, y se incluyeron en resina Epoxy, dejando polimerizar durante dos o tres días en cápsulas especiales a 60 °C. Posteriormente se realizaron cortes con un ultramicrotomo (Reichert - Hung automático). Dichos cortes se montaron sobre grillas de cobre y se realizó una última tinción con citrato de plomo al 1 %.

Observación de los preparados al microscopio electrónico

Las grillas con las muestras de fagos purificados y con bacterias infectadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss

EM109 - EM109 turbo y fotografiadas con una cámara incorporada de 35 milímetros cargada con película Kodak Technical Pam Film.

Para realizar mediciones de tamaño de las partículas virales se prepararon grillas con mezclas del fago estudiado y del bacteriófago T4. Este último se utilizó como estándar interno de calibración. Las dimensiones del bacteriófago T4 son 111 x 78 nanómetros de cabeza y 113 nanómetros de cola.

Características del genoma viral

Para determinar las características del genoma viral, el ácido nucleico del fago se extrajo de la siguiente manera:

Un lisado se trató con 10 % de PEG 6000 y 0,5 M de NaCl, el precipitado se resuspendió en buffer TE con 0,2 % de SDS y se calentó durante 15 minutos a 60 °C. Posteriormente el ácido nucleico se extrajo con un volumen de fenol equilibrado con 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,8; se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm y se recuperó la fase acuosa. A esta fase se le agregó un volumen de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm. La fase acuosa se extrajo con dos volúmenes de eter etílico, se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 rpm y el eter de la fase superior se descartó. El ácido nucleico presente en la fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,5 volúmenes de 7,5 M de NH₄OAc pH 7,5 por centrifugación durante 30 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en agua bidestilada estéril. La concentración de ácido nucleico se calibró mediante electroforesis en gel de agarosa en comparación con patrones de concentración y peso

molecular conocido sembrados en el mismo gel. Para ello las muestras se mezclaron con una solución de siembra (glicerol 10 %, EDTA 20 mM, SDS 0,2 % y 0,02 % de azul de bromofenol, pH 8) y se sembraron en un gel de agarosa 0,8 % en buffer TAE 1X (24,2 g de Tris base, 5,71 ml de ácido acético, 10 ml de una solución 0.5 M de EDTA, pH 8,5). La electroforesis se realizó a 20 volts/cm en buffer TAE 1X. Para visualizar el ADN, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 20 minutos y luego se observó a la luz UV (320nm) en un transiluminador. Cuando fue necesario el gel se fotografió con una cámara Polaroid con filtro rojo y con película Polaroid 667.

Tratamiento con desoxirribonucleasa y ribonucleasa

1 μg de ácido nucléico del fago se trató durante 1 hora a 37 °C con 1,5 o 10 mg/ml de DNAsa I pancreática y con 2, 4 o 8 mg/ml de RNAsa A, para determinar su naturaleza (ADN o ARN).

Tratamiento con nucleasa S1

0,3 μg de ácido nucleico del fago se trató durante 1 hora a 37 °C con 2 unidades/ml o 0,2 unidades/ml de nucleasa S1. En estas condiciones se observa digestión total de ADN o ARN de cadena simple y no se digiere ADN de cadena doble.

Tratamiento con exonucleasa Bal31

0,3 μg de ácido nucleico del fago se trató durante 1 hora a 37 °C con 0,2 unidades/ml de la enzima Bal31. Como control de digestión positivo se utilizó ADN del fago Lambda y como control de digestión negativo ADN del plásmido PBR322.

Tratamiento con enzimas de restricción

0,2 a 2 μg de ADN se digirieron durante 4 horas a 37 °C 10 unidades de diferentes enzimas de restricción; la reacción se realizó en las condiciones indicadas por el fabricante. Cuando se requirió eliminar el buffer de restricción, el ADN digerido se precipitó con 0,5 volúmenes de 7,5 M de NH_4OAc pH 7,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto por centrifugación durante 20 minutos a 10.000 rpm. Luego se resuspendió el pellet en agua bidestilada estéril.

Rango de huéspedes

Para determinar el rango de huéspedes infectables productivamente por el fago se seleccionaron 3 cepas del mismo género, algunas cepas de 10 géneros diferentes dentro de la familia a la cual corresponde el huésped, y 10 cepas de géneros distintos a la familia del huésped, entre ellos bacterias Gram positivas y Gram negativas; según lo recomendado por Ackermann et al, (1978).

El test de susceptibilidad de estas bacterias al fago se realizó diluyendo un stock de fagos y mezclando 0,1 ml de cada dilución con 0,1 ml de un cultivo exponencial de la cepa a ensayar en agar blando LB . Esta mezcla se volcó sobre agar LB sólido en placas de Petri. Luego de 48 horas de incubación a 37 °C se observó presencia o ausencia de placas de lisis en las distintas diluciones.

Composición de la partícula viral

Cantidad de ADN

Una alícuota de un stock concentrado del bacteriófago, purificado y dializado en buffer fago (7×10^{11} UFC/ml) se calentó 3 minutos a 60 °C en presencia de SDS 0,2 %, para liberar el ADN de las partículas virales. Posteriormente a la mezcla se le agregó un volumen de fenol equilibrado con 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,8, se agitó vigorosamente y se centrifugó. La fase acuosa fue recuperada, mezclada con buffer de electroforesis y sembrada en un gel de agarosa junto con patrones de peso molecular de concentración conocida. La concentración de ADN se estimó por comparación entre las intensidades de la banda de ADN del fago y de los patrones.

Cantidad de proteínas

Otra alícuota de la misma preparación de fagos utilizada para estimar la cantidad de ADN, se analizó en cuanto a su contenido de proteínas por el

método de Bradford (Sedmak & Grossberg, 1977) utilizando una curva de calibración elaborada en base a concentraciones conocidas de seroalbumina bovina (BSA).

Análisis cualitativo de proteínas virales

Marcación de proteínas de la partícula viral con ^{35}S .

5 ml. de cultivos exponenciales de las cepas huéspedes, en caldo LB: (*Kluyvera* cepa 21, *E.coli* B y *Klebsiella sp* 390); se infectaron con los fagos respectivos: el fago en estudio, T7 y K11 a una multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria y se incubaron 8 a 10 minutos a 37°C con agitación. Posteriormente se agregaron $20 \mu\text{Ci/ml}$ de metionina ^{35}S a cada cultivo y la incubación se prolongó por 30 a 40 minutos más hasta observar la clarificación de los cultivos debido a la lisis bacteriana.

Las partículas virales marcadas fueron purificadas y concentradas como se describió anteriormente. Después del paso de centrifugación se resuspendieron en buffer de siembra para electroforesis de proteínas (Tris-ClH $0,1 \text{ M}$ pH 6,8, β mercaptoetanol $0,8 \text{ M}$, SDS 2 % y glicerol 10 %) y se hirvieron durante 2 minutos.

Marcación de las proteínas virales sintetizadas en el huésped durante la replicación viral

Se utilizaron dos métodos de marcación:

1) Cultivos exponenciales de las cepas huéspedes, en caldo LB, se irradiaron con luz UV en condiciones tales que un 0,2 % de las células permanecían viables luego de la irradiación. Los cultivos irradiados se incubaron 5 minutos a 37 °C y luego se infectaron con los fagos correspondientes para cada cepa a multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria. Inmediatamente después se agregaron 40 $\mu\text{Ci/ml}$ de metionina ^{35}S y se cultivaron a 37 °C con agitación. A intervalos de 2 minutos se tomaron alícuotas de 0,5 ml. Cada alícuota se centrifugó a 0 °C durante 1 minuto a baja velocidad. El pellet conteniendo las células infectadas se resuspendió en 30 μl de buffer de siembra para electroforesis de proteínas y se calentó durante 2 minutos a 100 °C.

2) Cultivos exponenciales de las cepas huésped irradiadas con luz UV de la misma forma que en el método anterior se infectaron a una multiplicidad de infección de 10 fagos por bacteria y se incubaron a 37 °C con agitación. A distintos tiempos post-infección se tomaron alícuotas de 1 ml de cada cultivo. Estas alícuotas se incubaron por 3 minutos en presencia de 20 μCi de metionina ^{35}S a 37 °C con agitación. Posteriormente se centrifugaron a 0 °C durante 1 minuto a baja velocidad y el pellet de bacterias infectadas se resuspendió en 30 μl de buffer de siembra para electroforesis y se calentó durante 2 minutos a 100 °C.

Electroforesis de proteínas marcadas con metionina ^{35}S en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970)

Las proteínas virales marcadas con metionina ^{35}S se analizaron en geles planos de poliacrilamida 10 % en Tris-ClH 0,375 M pH 8,8; SDS 0,1 %, con

un gel espaciador de poliacrilamida 3,8 % en Tris-ClH 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1 %. En el mismo gel se sembraron proteínas patrones como marcadores de peso molecular. La electroforesis se desarrolló a 50 voltios durante 8 horas usando como buffer de corrida Tris-ClH 0,05 M pH 8,3; SDS 1 % y glicina 0,005 M. Todos los reactivos fueron marca Sigma. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R 250 0,25 % en metanol: agua: ácido acético (5:5:1) y se decoloró por varios lavados con metanol: agua: ácido acético (50:43:7).

Fluorografía

Una vez teñido el gel se preparó para fluorografía de acuerdo a la técnica de Bonner & Laskey, (1974). Finalmente se secó y se expuso a una película Agfa Curix RP1, a -20°C por quince días.

Efecto de agentes físicos y químicos

Estabilidad del fago a distintos valores de pH

A varios tubos conteniendo 1 ml de una suspensión de fagos se les adicionó 9 ml de medio LB previamente ajustado a distintos valores de pH con NaOH o HCl y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente el título de fagos de cada tubo se determinó por el método de Adams (1959).

Sensibilidad y estabilidad del fago a distintas temperaturas

La sensibilidad del fago a distintas temperaturas se ensayó colocando una serie de tubos cada uno conteniendo 1 ml de una suspensión de fagos en distintos baños de agua ajustados a diferentes temperaturas. A intervalos de tiempo convenientes los tubos fueron retirados del baño para titular el fago remanente.

Para determinar la temperatura óptima de almacenamiento de los stocks, varios tubos conteniendo una suspensión de fagos se colocaron a 4 °C y a -20 °C. A distintos intervalos de tiempo se tituló el fago remanente por el método de Adams (1959).

Sensibilidad a solventes orgánicos

La sensibilidad del fago al cloroformo y al dietil eter se ensayó adicionando 1 volumen de solvente a 3 volúmenes de una suspensión de fagos contenida en un frasco con tapa hermética. La mezcla se agitó a 120 rpm a temperatura ambiente. Luego de una hora de incubación, la mezcla se centrifugó a baja velocidad para eliminar el solvente y determinar el título del fago remanente en la fase acuosa.

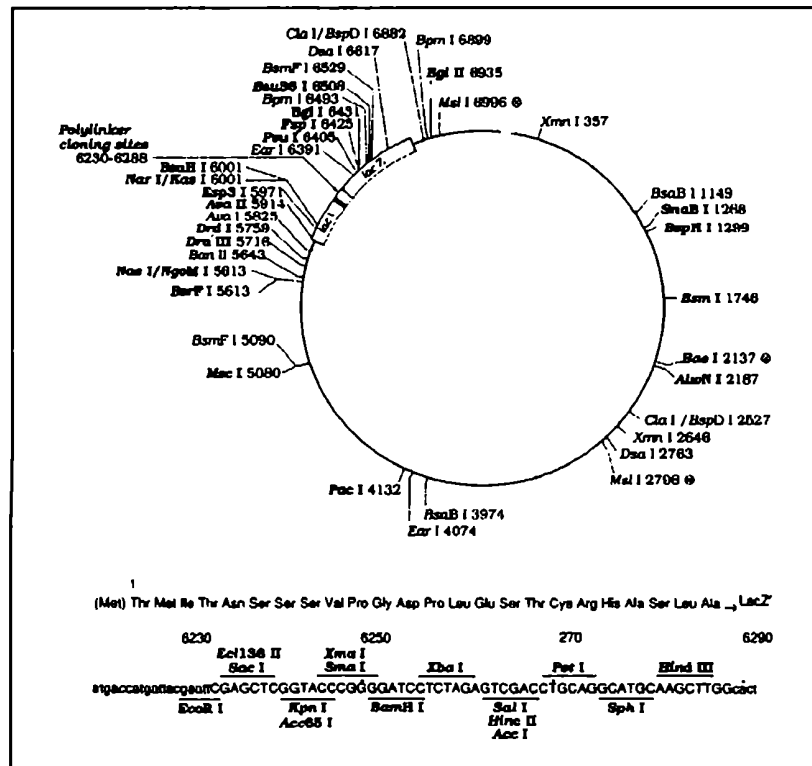
Dado que el cloroformo es un solvente muy usado para mantener lisados de fagos libres de bacterias vivas se ensayó la sensibilidad del fago a distintos porcentajes de cloroformo.

IV. DETERMINACION PARCIAL DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DEL GENOMA VIRAL

Clonado de fragmentos del genoma viral

Dos bibliotecas genómicas del fago se construyeron en *E. coli*. Para ello el ADN del fago se digirió con las enzimas de restricción HaeIII o AluI que cortan al ADN en fragmentos de entre 100 y 2000 pares de bases. Los fragmentos resultantes fueron independientemente ligados al sitio SmaI de la forma replicativa del fago M13mp18 (figura 7).

Figura N° 7: M13mp18



Este sitio se encuentra en la región de múltiples sitios de clonado ("polilinker") ubicado al comienzo del gen lac Z que codifica para la enzima que degrada la lactosa, la β galactosidasa.

La ligación se realizó con la enzima ADN ligasa del fago T4 en buffer ligasa (Tris-ClH 0,05 M, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, ditiotretitol 1 mM y 25 % de polietilenglicol-8000) a 37 °C durante 2 horas. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células competentes de *E.coli* cepa DH5 α F'Iq (ver método más adelante).

Los clones transformantes conteniendo ADN del fago de M13mp18 se seleccionaron mezclando en 3 ml de agar blando LB, una alícuota de células transformadas con isopropiltio- β -galactosido (IPTG) 1 mM (inductor de la enzima β galactosidasa) y 5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-galactopiranosido (Xgal) 0,004 % (cromógeno análogo de la lactosa que da un producto azul al ser digerido por la enzima β galactosidasa). Posteriormente se volcó el agar blando sobre placas con agar LB y se incubaron a 37 °C.

Las placas de retardo del crecimiento incoloras (por interrupción del gen lac Z) correspondientes a clones recombinantes fueron picadas y cultivadas en caldo LB. Minipreparaciones de ADN de la forma replicativa del fago M13 se realizaron por el método alcalino de Birboin y Doli, (1979). La presencia de fragmentos del genoma del fago en las formas replicativas de M13 de los clones recombinantes se analizó mediante digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de agarosa.

Preparación de células competentes

Para preparar células competentes, un cultivo exponencial de *E.coli* cepa DH5 α F'Iq crecido en medio Psi (2,5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 2,5 g de MgSO₄, pH 7,6) hasta DO₅₅₀ de 0,48 se enfrió 5 minutos a 0 °C y se centrifugó para eliminar el medio de cultivo. El sedimento de bacterias se resuspendió en 0,5 volúmenes de buffer TfbI (acetato de potasio 30 mM, 100 mM de KCl, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15 %, pH 5,8 ajustado con ácido acético glacial y filtrado) y se incubó 5 minutos a 0 °C. Se centrifugó nuevamente para eliminar el buffer TfbI. Luego se resuspendió el sedimento de bacterias en 0,1 volúmenes de buffer TfbII (MOPS o PIPES 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM y glicerol 15 %, pH 6,5 ajustado con KOH y filtrado) y se incubó 15 minutos a 0 °C. Las células competentes se fraccionaron en tubos plásticos de 1,5 ml para ser almacenadas a -70 °C.

Transformación

Las células competentes (50 μ l) se descongelaron lentamente a 0 °C y se mezclaron con no más de 20 μ l de una solución de ADN. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 0 °C y posteriormente 90 segundos a 42 °C (shock térmico). Luego una alícuota de la mezcla se agregó a agar blando LB con 1 mM de IPTG y 0,004 % de Xgal y se volcó sobre placas de Petri con agar LB. Dichas placas se incubaron por 15 horas a 37 °C antes de observar el resultado de la transformación.

Secuenciamiento del ADN del fago presente en los clones recombinantes

Para secuenciar los fragmentos del ADN del fago clonados en M13mp18, ADN de cadena simple de los fagos recombinantes se purificó de sobrenadantes de cultivos exponenciales de *E.coli* cepa DH5 α F'Iq infectados con cada fago recombinante (Sambrook et al, 1989). Las reacciones de secuenciamiento se realizaron por el método de Sanger et al, (1977) usando un kit comercial de secuencia (Sequenase 2.0 DNA. USB) utilizando como marca deoxiCTP α ³²P (NEN). Los "primers" que se utilizaron son oligonucleotidos sintéticos de 23 pares de bases que hibridan con el gen lac Z antes ("primer" directo) o después ("primer" reverso) de la region de multiples sitios de clonado.

Las reacciones de secuenciamiento se analizaron por electroforesis en una cuba apropiada (Bio Rad) en geles de poliacrilamida 8 % con 8 M de urea, en buffer TBE 1X (10,8 g de Tris base, 5,5 g de ácido bórico y 0,93 g de EDTA por litro de agua destilada) a 2000 volts manteniendo la temperatura entre 45 y 50 °C. Luego de la corrida el gel se expuso a una película Agfa Curix RP1 durante 18 horas. El revelado se efectuó por métodos convencionales.

Mapeo de fragmentos clonados del genoma viral por hibridación con ADN del fago digerido con distintas enzimas de restricción e inmobilizado sobre membranas de nylon

Algunos clones recombinantes de M13mp18 conteniendo fragmentos del genoma del fago fueron seleccionados para ser mapeados en el genoma del fago. Para ello ADN de la forma replicativa de los clones recombinantes se preparó por el método de Birboin & Doly, (1979), a partir de cultivos de *E. coli* cepa DH5 α F'Iq infectados. El ADN así extraído se digirió con las enzimas de restricción SstI y XbaI que cortan al vector por afuera del sitio de clonado, liberando el fragmento insertado. Los fragmentos fueron separados del vector mediante electroforesis en geles de agarosa (1 %) de bajo punto de fusión (BRL) en buffer TAE 1X. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio para visualizar sobre el transiluminador UV las bandas de ADN correspondientes a los distintos fragmentos. Estos fueron eluidos del gel de agarosa escindiendo la banda correspondiente y calentando a 37 °C para fundir la agarosa. Esta fue diluída con buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM). El ADN se precipitó con 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 7,5 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

Los fragmentos purificados de ADN se marcaron radioactivamente con ^{32}P , mediante el método de rellenado del extremo recesivo ("fill-in") generado por digestión con la enzima de restricción XbaI. 1 μg de ADN se mezcló con 2,5 u del fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa de *E. coli* (NEB), 2 μl de deoxiCTP $\alpha^{32}\text{P}$ (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) y 1 μl de una mezcla 0,5 mM de ATP, GTP y TTP y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el deoxi $\alpha^{32}\text{P}$ no incorporado mediante precipitación

con acetato de amonio y etanol. La sonda así preparada se controló por electroforesis en agarosa 1 % y posterior autorradiografía.

Por otro lado el genoma del fago se digirió con distintas enzimas de restricción y los fragmentos generados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió sobre un transiluminador de luz UV.

Mediante la técnica de Southern, (1975), los fragmentos de ADN presentes en el gel se desnaturalizaron con NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se neutralizó con NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 8 durante 30 minutos y los fragmentos de ADN se transfirieron a una membrana de nylon (Biodyne) del tamaño del gel con buffer SSC 10x (NaCl 1,5 M, citrato de sodio 0,5 M) durante toda la noche. Una vez completada la transferencia la membrana de nylon conteniendo los fragmentos de ADN del fago se incubó a 80 °C durante 2 horas para permitir la fijación del ADN.

Previamente a la hibridación, se incubó la membrana de nylon con buffer de hibridación (NaCl 150 mM, SDS 1 % y 0,3 % de leche descremada) durante 1 hora a 60 °C. Luego se agregó uno de los fragmentos del genoma del fago marcado con ³²P y desnaturalizado por calentamiento a 100 °C durante unos minutos. La incubación continuó por 18 horas a 60 °C (-24,92 de estringencia). Terminada esta incubación, la membrana de nylon se lavó por 5 veces con un buffer que contenía NaCl 15 mM y SDS 1 % a 60 °C (-8,32 de estringencia) y se expuso a una película para autorradiografía.

La membrana de nylon con las digestiones del genoma del fago se usó más de una vez para hibridar con distintos fragmentos marcados. Para ello se eliminó la sonda hibridada previamente, mediante tres lavados de 15 minutos

Materiales y métodos

a 100 °C en SDS 1 % y se procedió como se indicó anteriormente para hibridar con otra sonda.

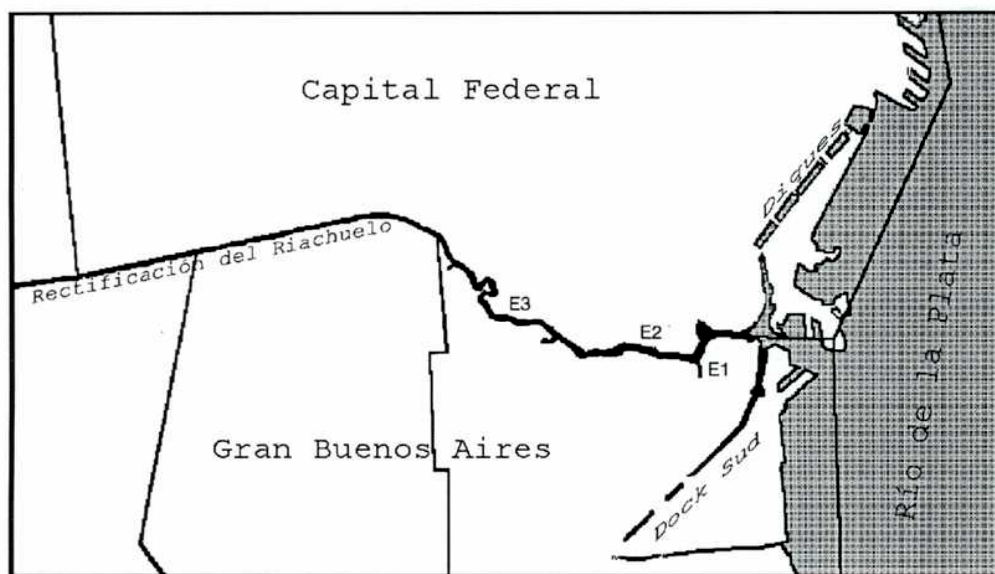
RESULTADOS

I. AISLAMIENTO DEL BACTERIOFAGO Y SU HUESPED

El primer paso para el aislamiento y posterior estudio de fagos presentes en una muestra de origen natural es la obtención de huéspedes susceptibles.

Para el caso del Riachuelo las muestras tomadas en distintas estaciones de muestreo E1, E2 y E3 (figura 8), fueron divididas en dos porciones. Una de ellas se utilizó para el aislamiento de bacterias que servirían como posibles huéspedes de los bacteriófagos presentes en la otra porción.

Figura N° 8: Ubicación geográfica de la estaciones de muestreo



Durante el aislamiento de bacterias huéspedes, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) presentes en las muestras. La densidad bacteriana del agua superficial (bacterioplancton) del Riachuelo resulto ser similar en las tres estaciones de muestreo:

E1: $3,6 \times 10^6$ UFC/ml

E2: $2,0 \times 10^6$ UFC/ml

E3: $7,0 \times 10^6$ UFC/ml

Debe tenerse en cuenta que de acuerdo al procedimiento utilizado estas bacterias son aeróbicas o anaeróbicas facultativas que crecen correctamente, en caldo LB en las condiciones de cultivo utilizadas y por lo tanto solo representan una subpoblación de las bacterias totales presentes en la muestra.

De las placas cuya dilución permitía la obtención de colonias aisladas se picaron 42 colonias al azar y estas se purificaron por pasajes sucesivos en agar LB.

Estos aislamientos correspondían, en su mayoría, a bacilos Gram negativos pleomórficos o cocobacilos Gram negativos

Las características microscópicas de las colonias de casi todos los aislamientos fueron similares: aspecto mucoso, brillante, lisas en general de borde entero de colores blanco, crema u ocre, salvo el caso del aislamiento 34 en el cual se observó la producción de un pigmento de color marrón que difunde al medio de cultivo. Este pigmento se estudió extensivamente y se identificó como perteneciente al grupo de las melaninas (Pavan et al, 1995). Por otro lado el aislamiento 21 luego de un tiempo prolongado de incubación en medio sólido presenta un aspecto rugoso característico, que sera descripto más adelante.

El aislamiento de bacteriófagos del agua del Riachuelo se llevo a cabo mediante plaqueo por el método de Adams, (1959), utilizando algunas de las cepas bacterianas aisladas del agua del Riachuelo como potenciales huéspedes y agua de las distintas estaciones previamente centrifugada y filtrada, como fuente de fagos. Solamente el aislamiento 21 de la estación de muestreo 2 presento placas de lisis frente a agua de la estación de muestreo 1. Se observaron 6 placas de lisis en 0,1 ml de agua. Al repetir el plaqueo del agua de la estación de muestreo 1 sobre la cepa 21, se obtuvieron 8 placas de lisis de aspecto similar a las ya observadas en 0,1 ml de agua. Solo una de las placas de lisis se amplificó y clonó mediante tres pasajes sucesivos en agar LB sobre la cepa 21. Se preparó un stock como se indica en materiales y métodos y se ensayo la susceptibilidad a este fago de los distintos aislamientos bacterianos realizados en agua del Riachuelo. Dos aislamientos de las estación de muestreo 2 mostraron desarrollo de placas de lisis con este fago. Ambos aislamientos coincidieron en sus características fenotípicas con el aislamiento 21.

II. IDENTIFICACION DEL HUESPED

Caracterización bioquímica de la cepa 21

La cepa 21, huésped del fago, es un cocobacilo Gram negativo. Las características bioquímicas que permiten su identificación fueron realizadas mediante ensayos bioquímicos clásicos (Mac Faddin, 1980 y Edwards & Ewing, 1972) y sistemas multitest de pruebas bioquímicas API 20E (para enterobacterias y otros Gram negativos) y API Rapid NFT (para gram negativos no fermentadores), (Analitab Products. Plainview, NY.). Los resultados de estas pruebas permitieron identificar a la cepa 21 como perteneciente al género *Kluyvera*. Estos resultados se muestran en la tabla 1 comparados con los obtenidos para las cepas *Kluyvera ascorbata* ATCC 14236 y *Kluyvera criocrescens* ATCC 14239 tomadas como patrones representativos de las características bioquímicas de las dos especies aceptadas para el género (Farmer et al, 1981). La tabla 3 presenta los resultados de las pruebas bioquímicas que se realizaron para diferenciar entre especies. Según estos la cepa 21 parecería incluirse dentro de la especie *K. criocrescens*. Sin embargo veremos que existen algunas manifestaciones fenotípicas de esta cepa que no son totalmente concordantes con esta conclusión.

Tabla N° 1: Características bioquímicas de *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens* y la cepa 21.

Test	<i>K. ascorbata</i> ATCC 14236	<i>K. cryocrescens</i> ATCC 14339	Cepa 21	Método
Producción de Indol	+	+	+	PBC, API
Rojo de Metilo	+	+	+	PBC, API
Voges-Proskauer	-	-	-	PBC, API
Utilización del Citrato (Simmons, Koser)	+	+	+	PBC, API
Producción de SH ₂	-	-	-	PBC, API
Urea (Christensen)	-	-	-	PBC, API
Fenilalanina deaminasa	-	-	-	API
Lisina decarboxilasa (Moeller)	+	-	+	PBC, API
Arginina dihidrolasa (Moeller)	-	-	-	PBC, API
Ornitina decarboxilasa (Moeller)	+	+	+	PBC, API
Motilidad	+	+	+	PBC
Licuefacción de la gelatina	-	-	-	PBC, API
Utilización del malonato	+	+	+	PBC
Producción de ácido a partir de D-glucosa	+	+	+	PBC, API
Producción de gas a partir de D-glucosa	+	-	-	PBC, API
Producción de ácido de:				
Lactosa	+	+	+	API
Sacarosa	+	+	+	API
D-manitol	+	+	+	API
Dulcitol	-	-	-	API

Resultados

Salicina	+	+	+	API
D-sorbitol	-	-	+	API
L-arabinosa	+	+	+	API
Rafinosa	+	+	+	API
L-ramnosa	+	+	+	API
Maltosa	+	+	+	API
D-xilosa	+	+	+	PBC
Trealosa	+	+	+	PBC
Eritritol	-	-	-	PBC
Melibiosa	+	+	+	API
D-arabitol	-	-	-	PBC
D-manosa	+	+	+	API
Hidrólisis de esculina	+	+	+	API
Utilización de acetato	+	+	+	API
Deoxiribonucleasa	-	-	-	PBC
Oxidasa (Kovacs)	-	-	-	PBC
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	+	+	+	PBC, API
ONPG (Orto-Nitrofenil-β-D-galctósido)	+	+	+	API
PNPG (Para-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido)	ND	ND	+	API NFT
Producción de pigmento	-	-	-	PBC
Utilización de:				
Gluconato	ND	ND	+	API NFT
Amigdalina	ND	ND	+	API NFT
Adipato	ND	ND	-	API NFT
Caprato	ND	ND	-	API NFT
Malato	ND	ND	+	API NFT
Triptofano	ND	ND	+	API NFT

Tabla N° 3: Determinación de especie por pruebas bioquímicas.

Test	<i>Kluyvera</i> <i>ascorbata</i> ATCC 14236	<i>Kluyvera</i> <i>criocrescens</i> ATCC 14239	<i>Kluyvera</i> cepa 21
Crecimiento en medio con ascorbato de sodio	+	-	-
Fermentación de D-glucosa a 5 °C (21 días)	-	+	+
Lisina decarboxilasa	+	-	+
Producción de gas en D-glucosa	+	- *	-

* El 80% de las cepas de esta especie dan resultado positivo .

Curva de crecimiento y morfología micro y macroscópica de la cepa 21

Para estudiar algunas características fenotípicas particulares de la cepa 21 se realizó una curva de crecimiento en caldo LB a 30°C a 120 rpm, donde la constante de ritmo de crecimiento en las condiciones en que se realizó la curva es de 2,4 duplicaciones/hora; calculada a partir de la ecuación:

$$K = \frac{\log_{10} X_t - \log_{10} X_o}{0,301 \cdot T}$$

Donde X_o : Número de bacterias a tiempo cero.

X_t : Número de bacterias en un tiempo posterior.

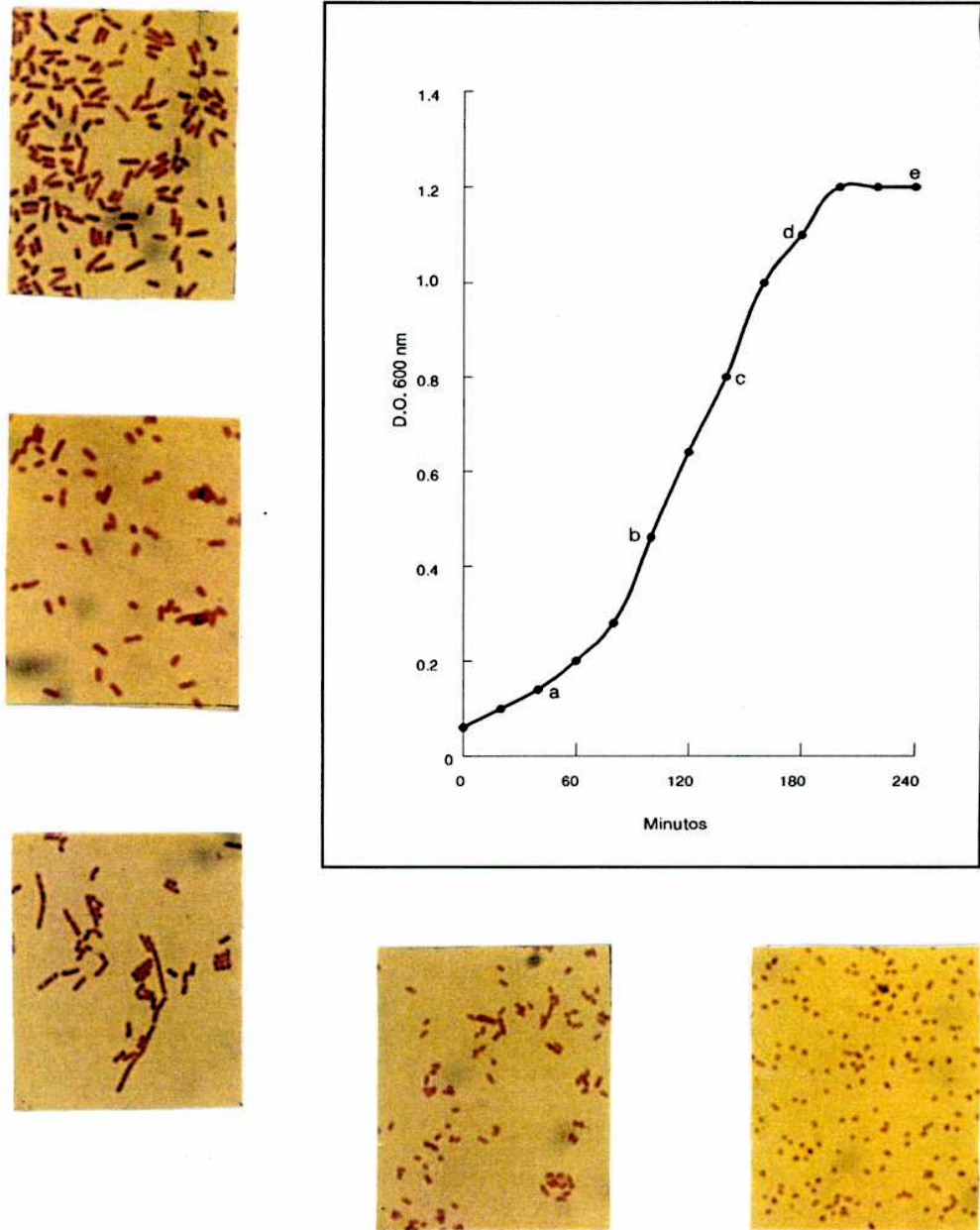
T : Tiempo que transcurre entre la medición X_o y X_t en horas

K : Constante de ritmo de crecimiento expresada en número de duplicaciones por unidad de tiempo.

La figura 9 muestra la curva obtenida y la variación morfológica observada en las células bacterianas teñidas mediante la coloración de Gram, tomadas en distintas fases del crecimiento.

Como se puede ver, en la fase de crecimiento exponencial las células son bacilos cortos, mientras que en la fase estacionaria son cocobacilos. Dicho cambio de morfología fue corroborado por microscopía electrónica de transmisión mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2 % pH 7 de células de cultivo exponenciales y cultivos estacionarios.

Figura N° 9: Curva de crecimiento y morfología microscópica de las bacterias de la cepa 21



Por otro lado la observación de las colonias de la cepa 21 luego de varios días de incubación a 30 °C revela un cambio en su aspecto macroscópico. Estas presentan un aspecto liso, de bordes netos, que cambia progresivamente a un aspecto rugoso (cerebroide) luego de más de 48 horas de incubación, (figura 10). Sin embargo no hay diferencias al observar microscópicamente sus células por observación directa, Gram o tinción negativa para presencia de cápsula. Las cepas *Kluyvera ascorbata* ATCC 14236 y *Kluyvera criocrescens* ATCC 14239 no mostraron cambios en su aspecto macroscópico luego de varios días de incubación.

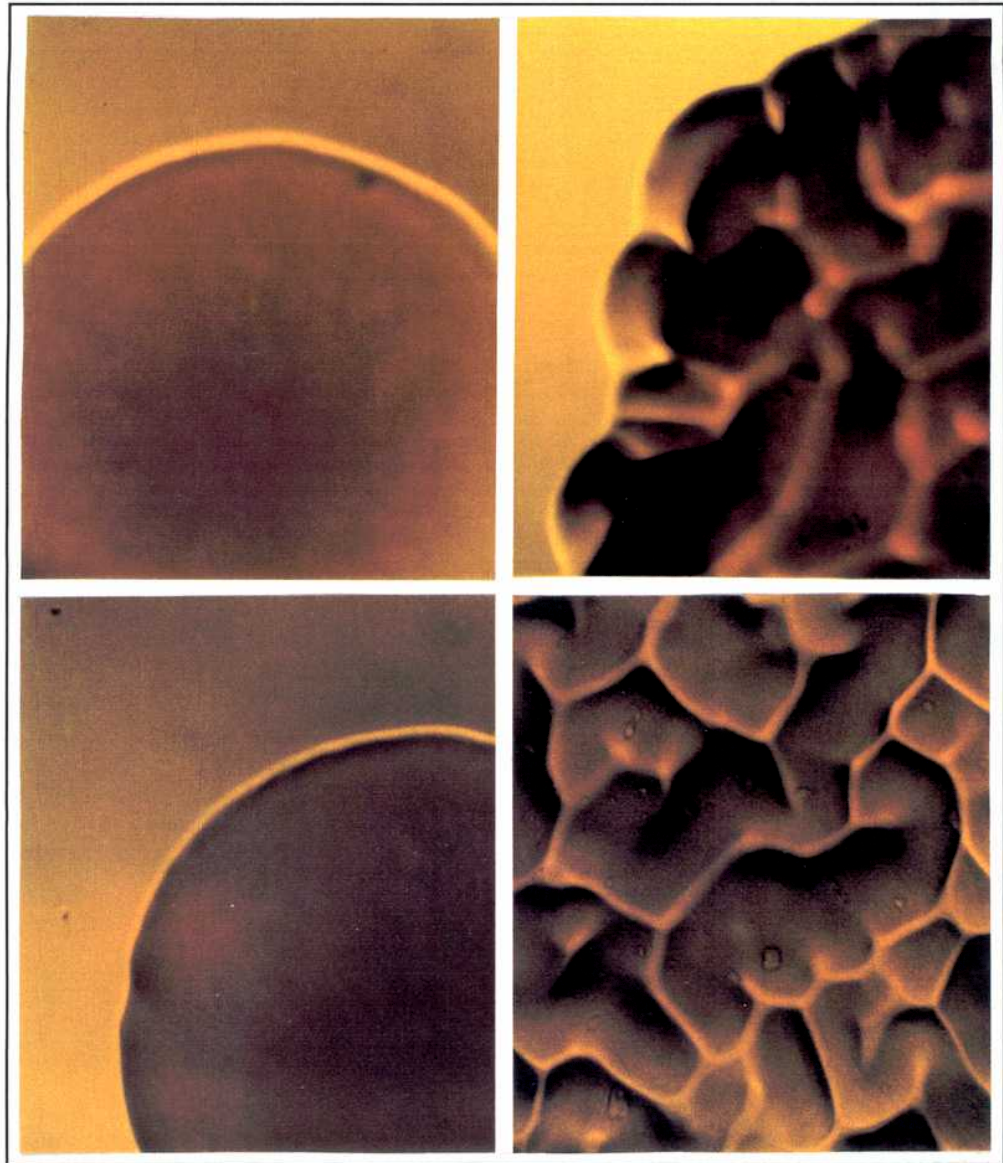
Sensibilidad a antibióticos

La sensibilidad o resistencia de la cepa 21 a distintos antibióticos se determinó mediante la técnica de antibiograma utilizando multidiscos. A continuación se indican los resultados obtenidos al comparar el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento con los valores tabulados para cada antibiótico.

Sensible a: Aminopenicilina sublactama, colistina, mezlocilina, fosfomicina, netilmicina, Astreonam, ceftacidima, ofloxacina, cefotaxima, cefixima, ciprofloxacina, gentamicina, amikacina, imipenem, piperacilina, tetraciclina, nitrofurantoina, norfloxacina, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, cefoperazona, cefoxitina y cefotizoxina.

Resistente a: Ampicilina, cloranfenicol, sulfisoxazol, cefuroxima y estreptomina.

Figura N° 10: Morfología macroscópica de las colonias de la cepa 21



El tamaño del halo de inhibición del crecimiento alrededor de un disco de cefalotina de 30 μg permite diferenciar entre las dos especies definidas para el género *Kluyvera*. *K. ascorbata* presenta halos menores de 17 mm de diámetro y mientras que *K. criocrescens* presenta halos de diámetros mayores. La cepa 21 cuyas pruebas bioquímicas corresponden a *Kluyvera criocrescens* no muestra correspondencia con esta especie en cuanto a este ensayo, ya que el diámetro del halo fue de 15 mm, (figura 11).

Figura N° 11: Halos de inhibición del crecimiento alrededor de discos de cefalotina. Arriba-izquierda: *Kluyvera ascorbata* ATCC 14236, arriba-derecha: *Kluyvera cryocrescens* ATCC 14239 y abajo: Cepa 21.



Análisis de plásmidos

Al realizar una extracción de ADN de la cepa 21 se observó que esta posee un plásmido de aproximadamente 2.700 pares de bases. Para analizar si este plásmido es el responsable de algunas de estas resistencias se intentó transformar células competentes de *E. coli* DH5 α F'Iq, de *K. ascorbata* ATCC 14236 y de *K. criocrescens* ATCC 14239 (ninguna de estas dos últimas poseen plásmidos) con una preparación de ADN del plásmido extraído de la cepa 21. Ningún transformante pudo ser obtenido cuando se seleccionó en placas de agar LB conteniendo ampicilina o cloranfenicol.

Resistencia a metales pesados

La cepa 21 es capaz de desarrollar en medio LB suplementado con distintas concentraciones de metales pesados. Las concentraciones máximas ensayadas, en las cuales se observó desarrollo fueron: 5 ppm de Hg⁺, 10 ppm de Ag⁺, 3 ppm de Cd²⁺, 100 ppm de Pb²⁺, 30 ppm de Cu²⁺ y 800 ppm de Zn²⁺. Estos valores superan ampliamente las concentraciones de estos metales encontradas en el Riachuelo (Informe de AGOSBA-OSN-SIHN, 1994).

Susceptibilidad de la cepa 21 a otros fagos

Los bacteriófagos Lambda, P1, T6, T4, T2, T7, y M13 de *E. coli*, y el fago K11 de *Klebsiella* se ensayaron sobre la cepa 21; ninguno formó placas

de lisis. Tampoco las cepas *Kluyvera ascorvata* ATCC 14236 y *Kluyvera criocrescens* ATCC 14239 y 33435 fueron susceptibles a estos fagos.

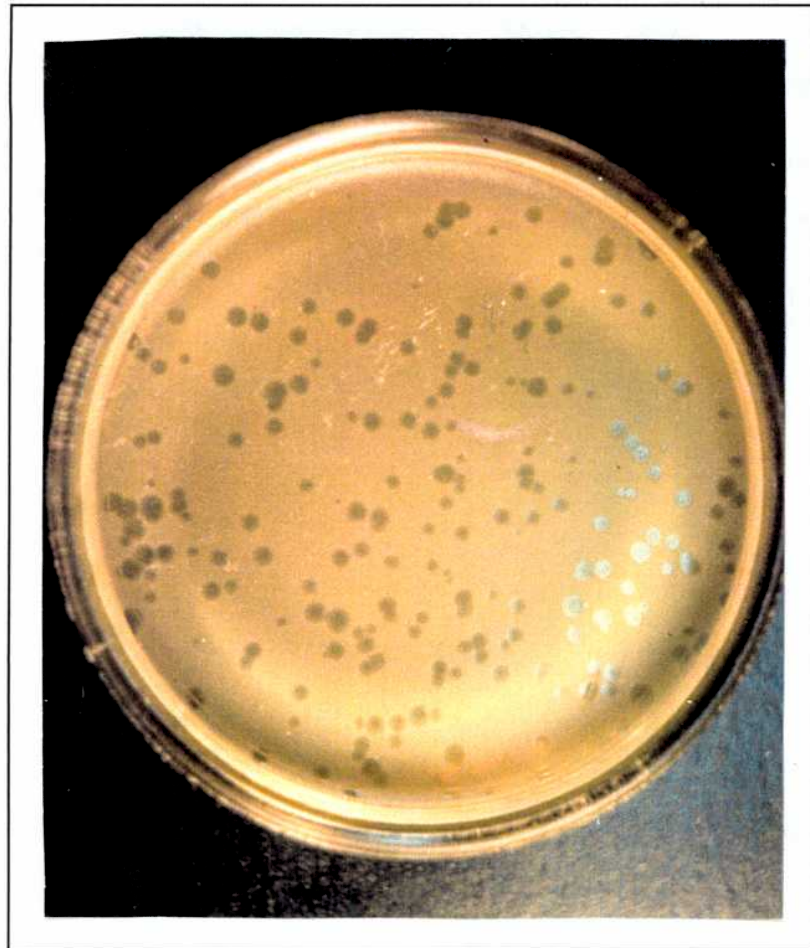
III. CARACTERIZACION DEL BACTERIOFAGO

En lo sucesivo se denominará al bacteriófago aquí descrito como Kvp1 ("*Kluyvera* phage 1")

Características de las placas de lisis

Al titular un stock del fago producido a partir de una única placa de lisis observamos que existe una marcada diferencia en el tamaño de las placas individuales, estas oscilan entre 1 y 5 mm, (figura 12). Esta característica se repite clonando placas de lisis de distinto tamaño, diferenciadas en placas pequeñas (entre 1 y 2 mm), medianas (entre 3 y 4 mm) y grandes (más de 5 mm), lo que estaría indicando que la variedad en el tamaño de las placas es una característica intrínseca de este fago, es decir no habría subpoblaciones genéticamente definidas que muestren distinto tamaño de placa de lisis.

Figura N° 12: Placas de lisis del fago en agar LB



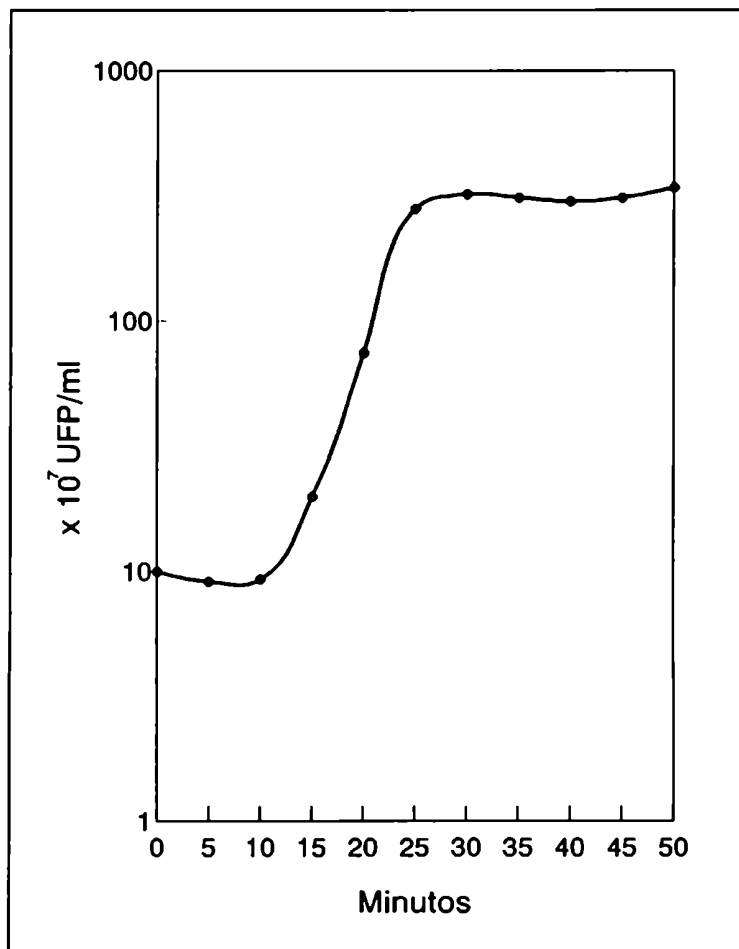
Curva de un solo ciclo

La figura 13 muestra la gráfica obtenida al titular el fago producido durante el tiempo que dura un ciclo de replicación viral, esta corresponde a la

de un fago lítico dado que paralelamente a la liberación de la progenie viral se produce la lisis de las células infectadas.

No se observó inducción de fagos en cultivos de bacterianos tratados con luz UV obtenidos de colonias pequeñas que desarrollaban en el interior de las placas de lisis. Los cultivos de dichas colonias resultaron ser resistentes a la infección con el fago.

Figura N° 13: Curva de un solo ciclo



De la curva se estimó que el período de latencia es de aproximadamente 13 minutos y un período de eclosión de 10 minutos. La productividad aparente a juzgar por el recuento de UFP resultó de aproximadamente 30 fagos por célula infectada, sin embargo la cantidad de ácido nucleico del fago producido observado mediante electroforesis en gel de agarosa (teniendo en cuenta el peso molecular del genoma viral, ver más adelante) corresponde a aproximadamente 3 veces el número de partículas estimado por titulación. Esta característica también fue observada en el bacteriófago T7 y K11 de *E. coli* y *Klebsiella* respectivamente cuya productividad es significativamente mayor. Probablemente en estos fagos solo una fracción del ácido nucleico viral empaquetado se encuentra en partículas con capacidad de formar placas o bien la formación de agregados de varias partículas ocurriría frecuentemente.

Densidad de flotación de la partícula viral

Un stock de fagos concentrado se purificó en un gradiente isopícnico de CsCl. El gradiente se colectó en fracciones en las cuales se midió el índice de refracción y el número de partículas infectivas por el ensayo de formación de placas de lisis.

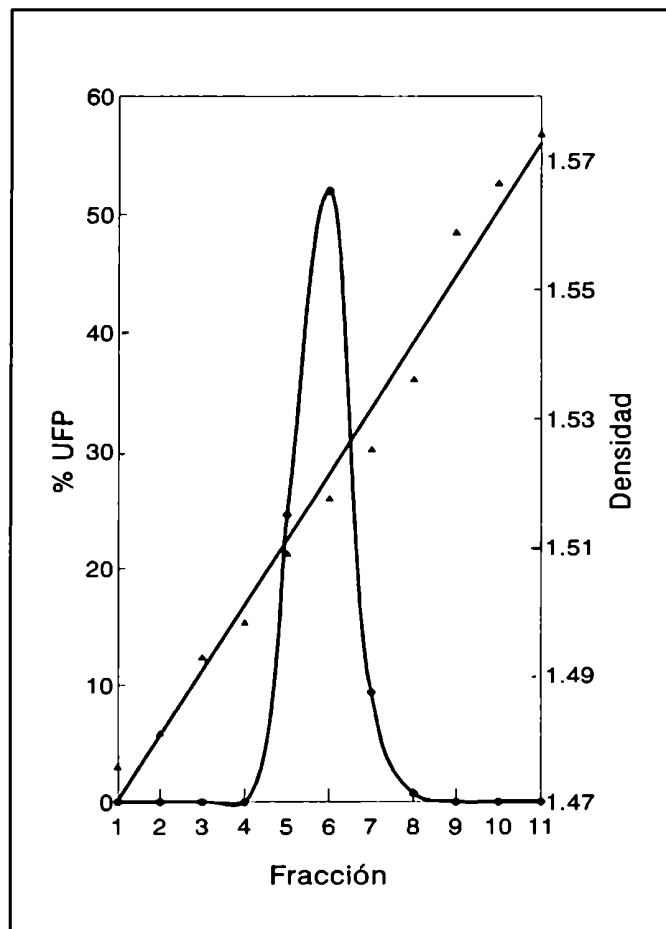
Según Bruner & Vinograd, (1965), la relación entre el índice de refracción (r) y la densidad de una solución (δ) a 25 °C esta representada por la siguiente ecuación para densidades de soluciones mayores a 1,37 g/cm³:

$$\delta = (10,8601 \times r) - 13,4974$$

Teniendo en cuenta que las partículas bandean isopícnicamente, la densidad de las partículas determina la exacta ubicación en el gradiente. Por

lo tanto la densidad de la fracción donde se hallan concentradas las partículas corresponderá a la densidad de estas. Del gráfico presentado en la figura 14 se deduce que la densidad de flotación de Kvp1 en CsCl es de $1,517 \text{ g/cm}^3$.

Figura N° 14: Densidad de flotación de Kvp1 en CsCl



Determinación del tipo de ácido nucleico del genoma viral

Para determinar la naturaleza del genoma viral, el ácido nucleico de Kvp1 se trató con desoxiribonucleasa I y con ribonucleasa A, observándose en geles de agarosa digestión con la primera enzima y no con la segunda lo cual indica que el genoma viral es ADN, (figura 15A).

El tratamiento del ADN viral con la nucleasa S1 (enzima que degrada ADN o ARN de cadena simple en 5' mononucleotidos), a concentraciones en las cuales el ADN de cadena simple del fago M13 es totalmente digerido mientras que no así su forma replicativa (cadena doble) demostró que el ADN de este fago no es digerido y por lo tanto se trata de ADN de cadena doble, (figura 15A).

Para determinar si el genoma de Kvp1 es, lineal o circular, el ADN viral se incubó durante distintos períodos con exonucleasa Bal 31 (enzima que digiere el ADN de cadena doble a partir del extremo 5' en forma progresiva), observándose una degradación progresiva con el tiempo de incubación resultando el ADN del fago digerido con un peso molecular menor que el correspondiente al ADN del fago sin tratar, ADN del fago Lambda digerido con HindIII y ADN del plásmido PBR322 se usaron como controles de digestión positivo y negativo respectivamente (figura 15B). Este resultado indica que el ADN de bacteriófago Kvp1 es lineal y que sus extremos estan expuestos.

Figura N° 15A: Características del genoma viral. **1a**: Tratamiento de la forma replicativa de M13 con nucleasa S1. **1b**: Forma replicativa M13 sin tratar. **2a**: ADN de M13 de cadena simple tratado con nucleasa S1. **2b**: ADN de M13 de cadena simple sin tratar. **3a**: ADN del fago Kvp1 tratado con nucleasa S1. **3b**: ADN del fago Kvp1 sin tratar. **4**: ADN del fago Kvp1 tratado con desoxiribonucleasa I. **5**: ADN del fago Kvp1 tratado con ribonucleasa A.

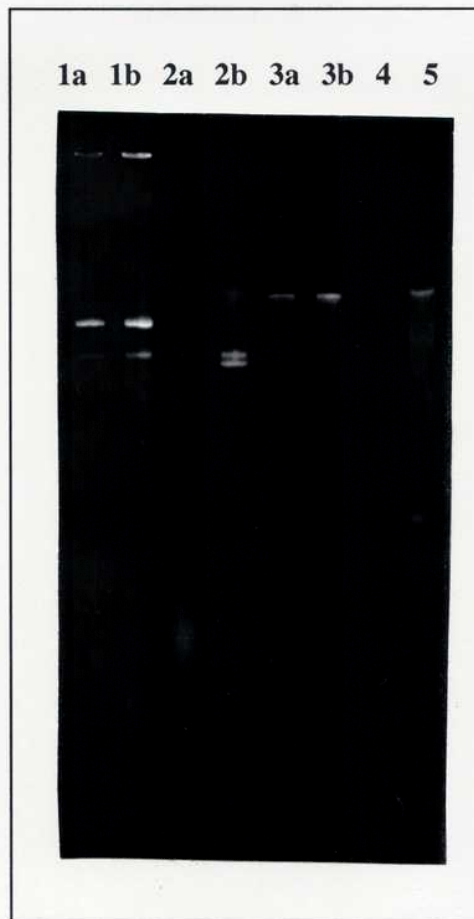
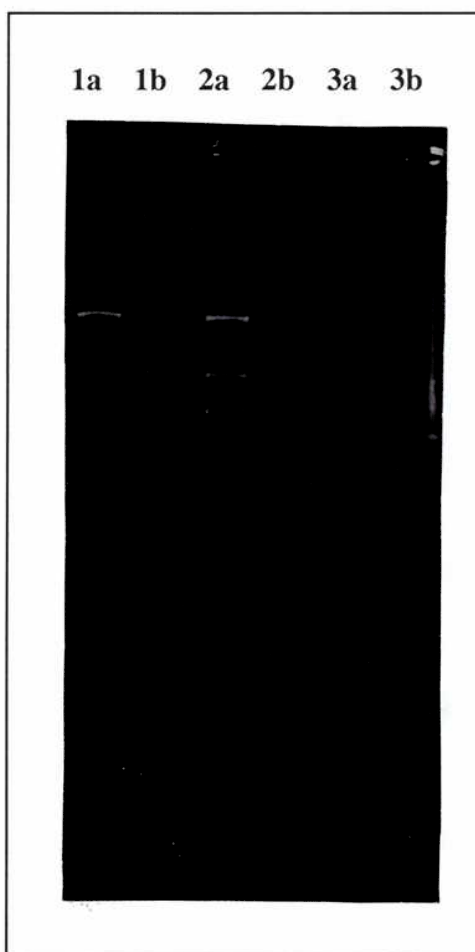


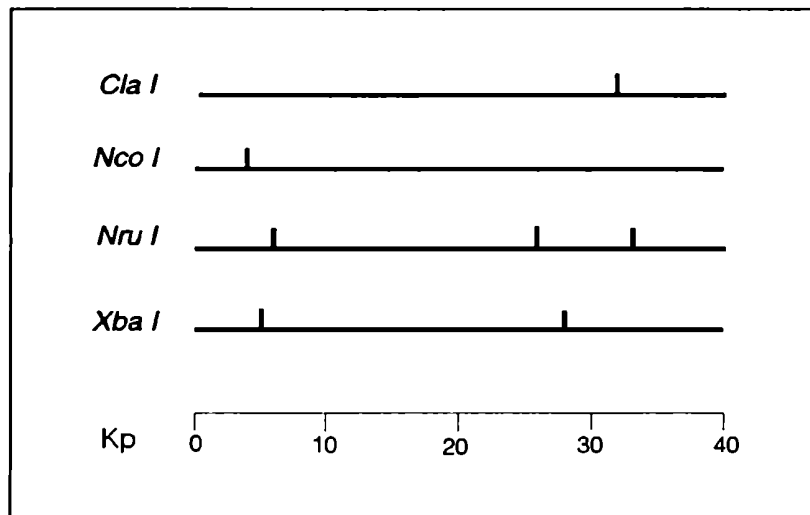
Figura N° 15B: Características del genoma viral. **1a**: ADN del fago Kvp1 sin tratar. **1b**: ADN del fago Kvp1 tratado con exonucleasa Bal31. **2a**: ADN del fago Lambda digerido con HindIII. **2b**: ADN del fago Lambda digerido con HindIII tratado con exonucleasa Bal31. **3a**: PBR322. **3b**: PBR322 tratado con exonucleasa Bal31.



La figura 16 muestra el mapa de restricción del genoma viral obtenido por digestiones dobles y triples con las enzimas *NruI*, *ClaI*, *NcoI* y *XbaI*. Sumando los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos se puede estimar un peso molecular del ADN viral de aproximadamente 40.000 pares de bases.

Además de las enzimas de restricción ya mencionadas el ADN viral puede ser digerido con: *AluI*, *HaeIII*, *HincII*, *HpaI*, *HpaII*, *MboI*, *MspI*, *NdaI*, *Sau3A*, y no se digiere con: *ApaI*, *BamHI*, *BglII*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NarI*, *NotI*, *PstI*, *PvuI*, *PvuII*, *SalI*, *SmaI*, *SphI* y *SstI*.

Figura N° 16: Mapa de restricción del genoma del fago.

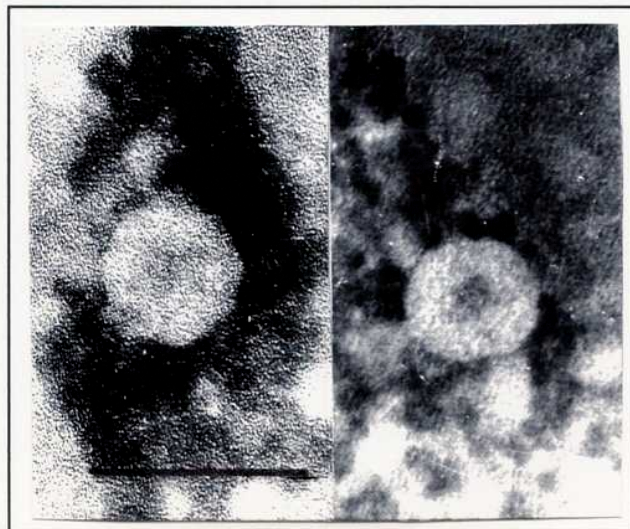
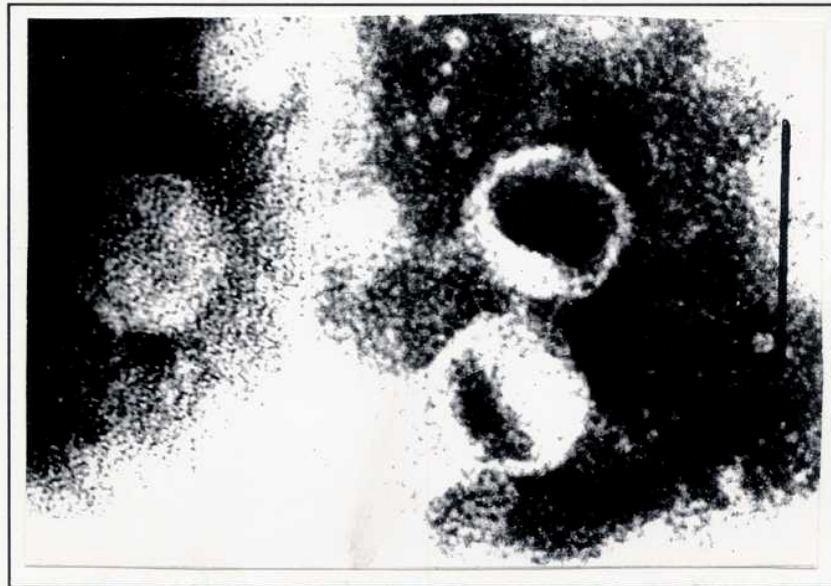


Microscopía electrónica de las partículas virales

Una suspensión de fagos purificados dializada con acetato de amonio 0,1 M se tiñó negativamente con fosfotungstato de potasio al 2 % pH 7. En la

figura 17 se puede observar algunas partículas virales, estas muestran una cápside icosaédrica de aproximadamente 70 nanómetros. No muy claramente en algunas partículas se observó una cola corta de aproximadamente 12 nm.

Figura N°. 17: Microfotografía electrónica del fago Kvp1. Barra 100 nm.



Microscopía electrónica de cortes ultrafinos de bacterias infectadas

Muestras de cultivos de bacterias infectadas fueron tomadas a distintos tiempos post-infección para realizar cortes con ultramicrotomo y así obtener cortes ultrafinos que permitan analizar algunos eventos intracelulares durante la replicación viral.

Las bacterias no infectadas mostraron por esta técnica una o dos zonas intracelulares electrodensas (claras) bien definidas correspondientes al genoma bacteriano. Entre 2 y 5 minutos post-infección no se observaron cambios en la ultraestructura de estas células, sin embargo, se observaron partículas virales adsorbidas a la pared bacteriana por medio de apéndices no muy bien definidos (figura 18). Entre 6 y 20 minutos post-infección se observó una desaparición gradual del genoma bacteriano, que aparece en forma de manchas electrodensas. Esta desaparición gradual del genoma se acompaña de la aparición también gradual de pequeños agregados electrodensos próximos a la membrana celular. Hacia el final de la infección se encuentran células cuyo contenido intracelular está totalmente desorganizado y una gran cantidad de restos celulares (figura 19).

Figura N° 18: Microfotografía electrónica de un corte de bacterias infectadas de la cepa 21 con partículas virales adsorbidas. Barra 100 nm.

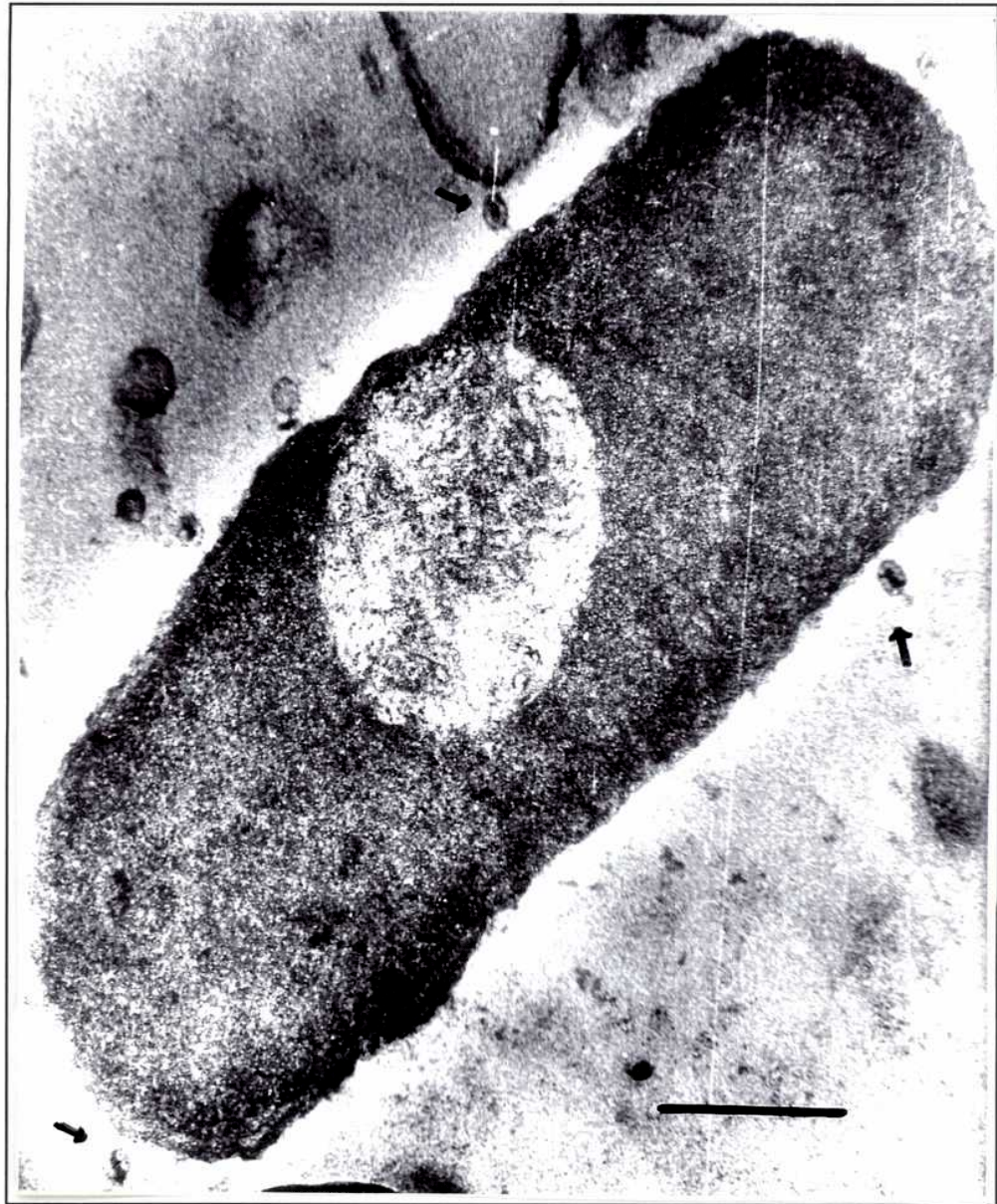
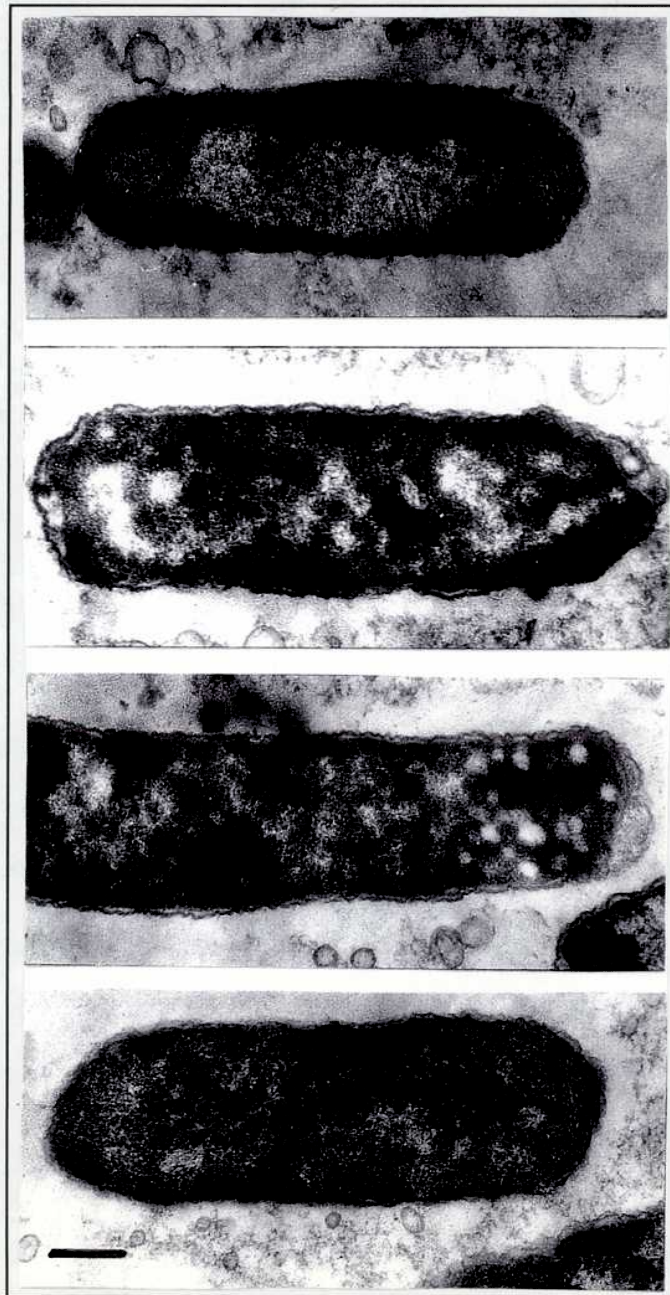


Figura N° 19: Microfotografía electrónica de cortes de bacterias de la cepa 21 mostrando los eventos que ocurren intracelularmente a distintos tiempos post infección. Barra 0.5 μ



Los eventos aquí observados podrían corresponderse con los ya conocidos para el caso de células infectadas con el bacteriófago T7. Este último fago realiza un "shutoff" de la síntesis de proteínas y de los ácidos nucleicos de la célula huésped degradando el genoma bacteriano y tomando los productos de dicha degradación como precursores de la síntesis de su propio genoma.

Para el fago Kvp1, las partículas inmaduras intracelulares fueron muy difíciles de observar dado que solo se producen alrededor de 30 partículas por célula infectada. Realizando cortes muy finos de células infectadas con el fago T7, se ha observado zonas electrodensas posiblemente de ADN viral rodeadas de partículas inmaduras. Los agregados electrodensos observados en células infectadas con el bacteriófago Kvp1 parecen corresponder dada su localización a restos de ADN bacteriano condensado tal como se ha observado en células infectadas con el bacteriófago T4 (Snustad et al ,1983).

Rango de huéspedes

Se probó la susceptibilidad a Kvp1 de distintas bacterias con el fin de determinar el rango de huéspedes de este bacteriófago.

Se ensayaron las siguientes cepas pertenecientes a distintas especies de enterobacterias: *E. coli* B (F-), huésped de T7, *E. coli* K12 (F-), *E. coli* C 600 (F-, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, mcrA), *E. coli* DH5 α F'Iq (F', pMC9/ endA1, hsdR17 ($r_k^- m_K^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Nal^r), relA1, Δ (lacZYA-argF)_{u169}, (80lacZ Δ m15)), *E. coli* JM 83 (F-), *E. coli* (HFR H 3000), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp.* 11, huésped de K11,

Enterobacter aerogenes, *Enterobacter intermedio*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sp*, *Salmonella oranienbourg*, *Salmonella newport*, *Serratia marcescens*.

Como así también se ensayaron cepas de géneros no pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*.

Ninguna de estas cepas fue susceptible al fago Kvp1 cuando se ensayó por formación de placas de lisis sobre un césped bacteriano luego de 48 horas de incubación.

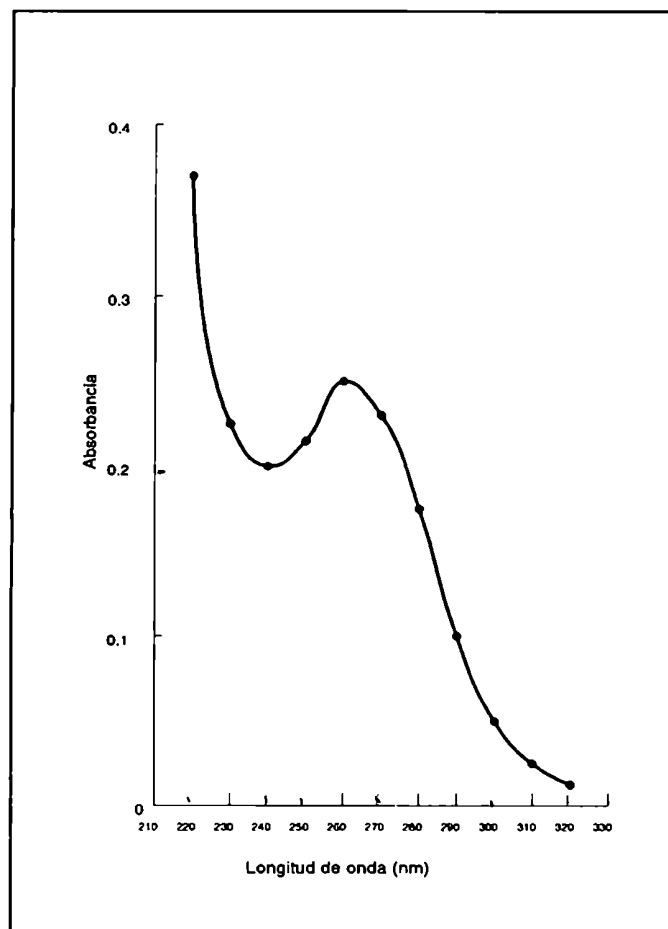
Además aún las cepas del mismo género que el huésped natural: *Kluyvera ascorbata* ATCC 14236, *Kluyvera criocrescens* ATCC 14239 y *Kluyvera criocrescens* ATCC 33435 no son susceptibles al bacteriófago Kvp1 lo cual parece indicar una marcada especificidad de huésped.

Espectro de absorción a la luz UV y porcentajes de ADN y proteína de la partícula viral

Una suspensión de fagos concentrada y purificada se analizó mediante la realización del espectro de absorción a la luz UV. Según Sinsheimer, (1959), para preparaciones de virus libre de impurezas el espectro debe mostrar una relación de absorbancia a 260nm/280nm de aproximadamente 1,53 y una adsorbancia mínima a 240nm. El espectro de absorción a la luz UV

obtenido (figura 20) es similar al reportado para los fagos ϕ x174, P22 y T7 (Yamamoto & Alberts, 1970). Con esta suspensión de fagos pura se estimó que la partícula viral posee aproximadamente un 55 % de ADN y un 45 % de proteínas (ver materiales y métodos).

Figura N° 20: Espectro de absorción de Kvp1 a la luz UV



Análisis de las proteínas presentes en la partícula viral

La composición de proteínas de las partículas virales purificadas se analizó marcando dichas partículas con metionina ^{35}S y desarmándolas por calentamiento con SDS y β mercaptoetanol. Las proteínas liberadas se compararon por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (10 %) y se detectaron por autorradiografía.

Diez proteínas virales pudieron ser identificadas en las partículas virales purificadas (figura 21). Entre ellas una proteína de 36.000 Daltons de peso molecular, cuya abundancia relativa corresponde al 60 % de la marca, indicando que es la proteína mayoritaria de la partícula viral.

Al comparar el perfil electroforético de proteínas del fago T7 de *E. coli* y el fago K11 de *Klebsiella* con las de Kvp1 se observa que los pesos moleculares y las intensidades relativas son bastante similares, (figura 22). Dado que estos fagos son morfológicamente idénticos podemos homologar las proteínas que presenta Kvp1 con las ya caracterizadas para el bacteriófago T7 (Studier & Maizel, 1969). Este mismo tipo de comparaciones ha sido realizado por Korsten et al, (1979) en su estudio de fagos relacionados con T7 dentro de los cuales se encuentra el fago K11.

Figura N° 21: Perfil electroforetico de las proteínas de la partícula viral

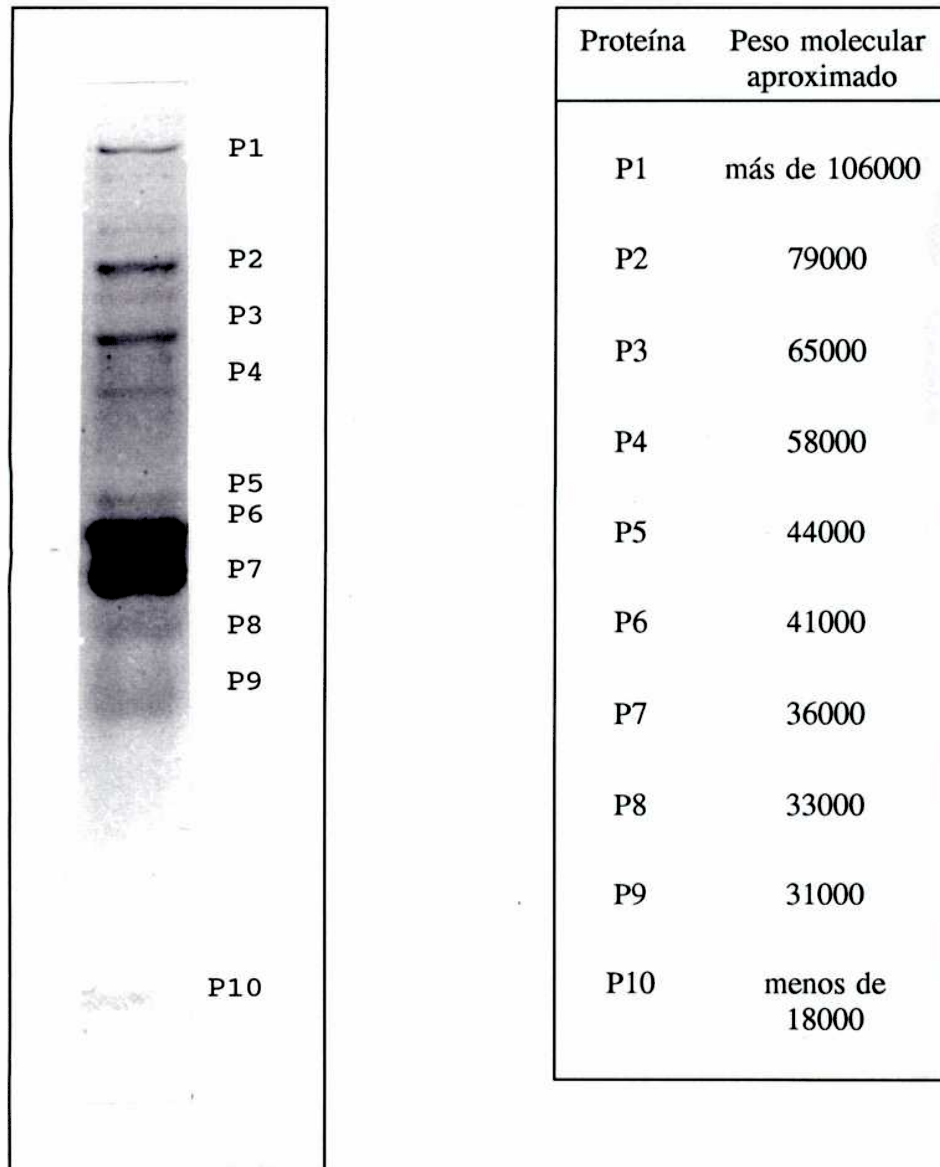
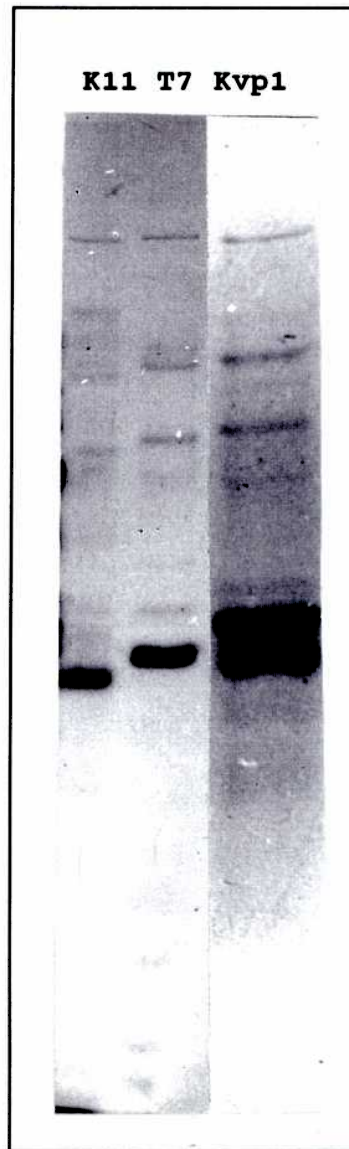


Figura N° 22: Perfil electroforetico de proteínas de la partícula de los fagos T7, K11 y Kvp1



Análisis de las proteínas sintetizadas en las células infectadas

Como se indicó en materiales y métodos, alícuotas de un cultivo de células infectadas, marcadas con metionina ^{35}S se tomaron a distintos tiempos post-infección y se calentaron en presencia de SDS y β mercaptoetanol a 100°C . Las proteínas liberadas se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (10 %), que luego fueron expuestos a una película radiografía.

Si bien se observó un patrón de bandas característico correspondiente a las proteínas del fago, este método no resultó satisfactorio para observar un patrón secuencial de síntesis de proteínas virales.

Para poder observar que proteínas eran sintetizadas por las células infectadas durante ciertos períodos del ciclo de replicación viral; se tomaron alícuotas de células infectadas a distintos tiempos post-infección y se les agrego un pulso de 3 minutos de metionina ^{35}S . Una vez tomadas las muestras fueron inmediatamente procesadas para su análisis en geles de poliacrilamida.

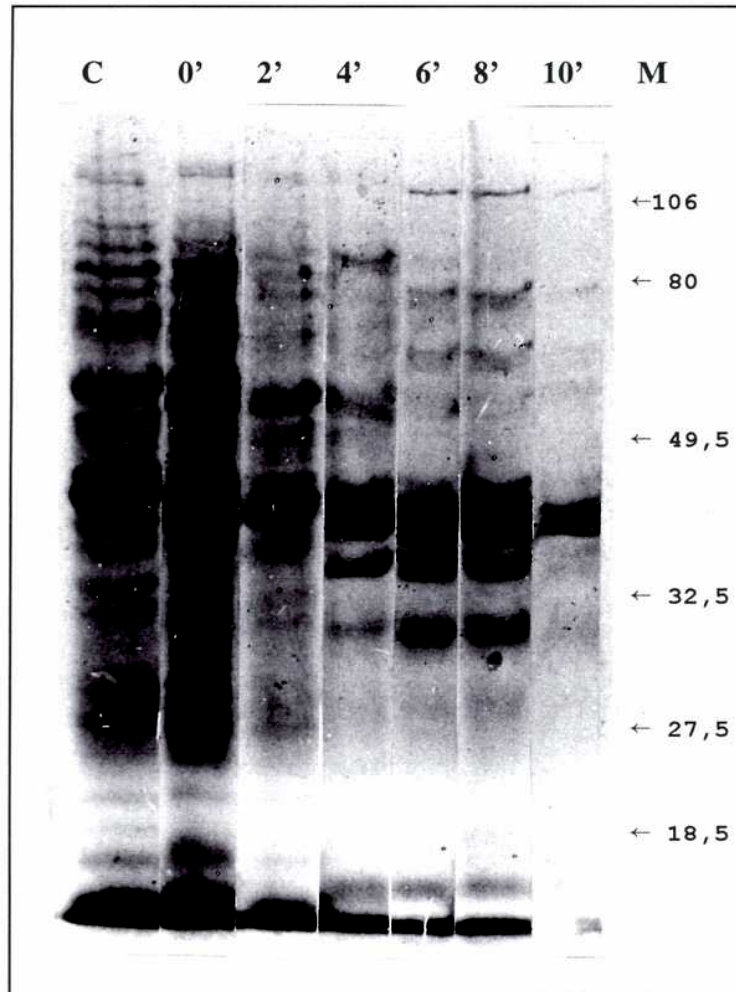
A los 4 minutos post-infección se observó un gran cambio en el esquema de bandas lo que indicaría que pasado ese lapso de tiempo se detiene la síntesis de proteínas bacterianas. Además a medida que transcurre la infección, se observaron bandas que por su peso molecular corresponderían a proteínas estructurales de la partícula viral, (figura 23).

Al comparar los resultados obtenidos con los perfiles de síntesis de proteínas de células infectadas con los fagos T7 y K11 se observó que eran similares, ya que varias de las bandas presentan igual peso molecular e intensidad, además de aparecer aproximadamente al mismo tiempo post-infección. Del mismo modo que para las proteínas estructurales, es posible homologar las proteínas intracelulares sintetizadas por la célula huésped ya

caracterizadas para el caso de la infección con el bacteriófago T7 con las bandas de células infectadas con el bacteriófago Kvp1 que poseen igual comportamiento electroforético; entre ellas una proteína de peso molecular aparente 100.000 que aparece en la etapa temprana del ciclo de replicación y que podría corresponder a la ARN polimerasa, esta proteína es producto del gen 1 en el fago T7 y dirige la transcripción de los ARN mensajeros de las proteínas sintetizadas durante la etapa tardía. También otra proteína temprana de peso molecular 40.000 sería homologable a la proteína quinasa de T7, producto del gen 0,7 cuya función es inactivar la ARN polimerasa del huésped durante el pasaje de la etapa temprana a la tardía.

Para poder observar otras proteínas que se sinteticen en la etapa temprana y que puedan estar enmascaradas por las proteínas sintetizadas por la célula huésped durante esta etapa; los cultivos fueron tratados previamente a la infección con luz ultravioleta para anular la síntesis de proteínas bacterianas previa al "shutoff" viral. El perfil electroforético obtenido a tiempos cortos post-infección en dichas células irradiadas no muestra nuevas bandas antes de los 6 minutos, además luego del este tiempo el perfil de bandas es idéntico al presentado por las células no tratadas con luz ultravioleta. Este resultado probablemente se deba a que las proteínas tempranas se producen en cantidades muy pequeñas en comparación con las estructurales y el tratamiento con luz ultravioleta reduce la productividad viral, lo que en este caso se ve agravado por la escasa productividad natural del bacteriófago Kvp1 con respecto a los bacteriófagos T7 o K11 (Studier & Maizel, 1969 y resultados observados aquí).

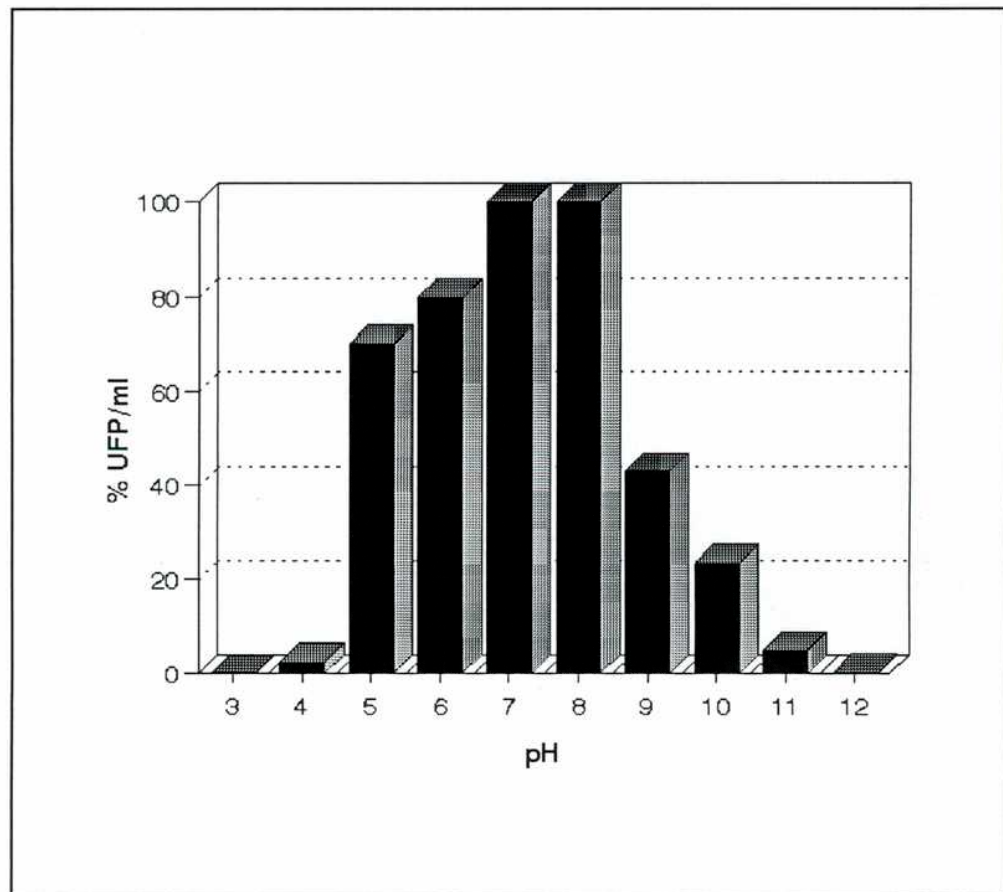
Figura N° 23: Perfil electroforético de las proteínas intracelulares sintetizadas en la bacteria huésped durante infección viral. C: control de células no infectadas, M: marcadores de peso molecular.



Estabilidad y sensibilidad de Kvp1 a agentes físicos

Bajo las condiciones ensayadas el fago fue estable dentro de un rango de pH de 5 a 9 con una perdida importante de la infectividad a pH 4 y a pH 12, (figura 24).

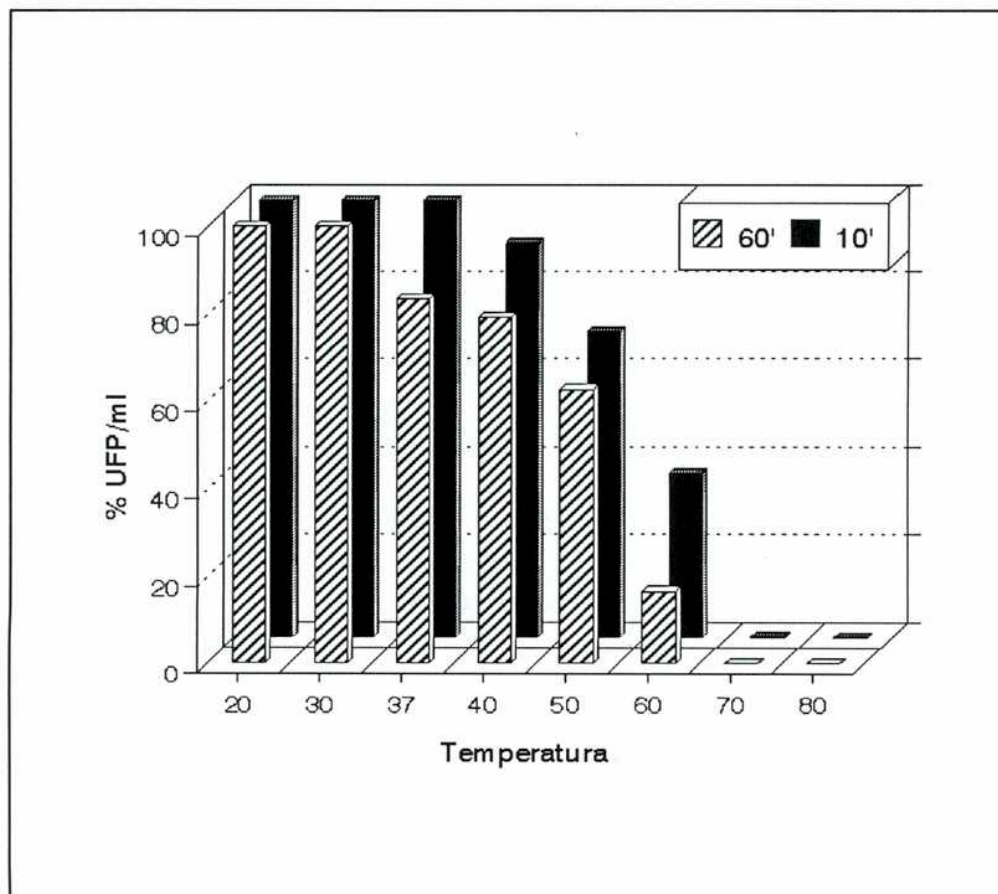
Figura N° 24: Estabilidad de Kvp1 a distintos valores de pH



En cuanto a la sensibilidad a distintas temperaturas, se observó una caída en el título de aquellas muestras incubadas a más de 60 °C, con pérdida total de fagos infectivos luego de tratar las suspensión durante 10 minutos a 70 °C, (figura 25).

Por otro lado los lisados libres de bacterias pueden se almacenados durante 6 meses a 4 °C y por más de 1 año a -20 °C sin pérdida considerable del título.

Figura N° 25: Sensibilidad de Kvp1 a distintas temperaturas



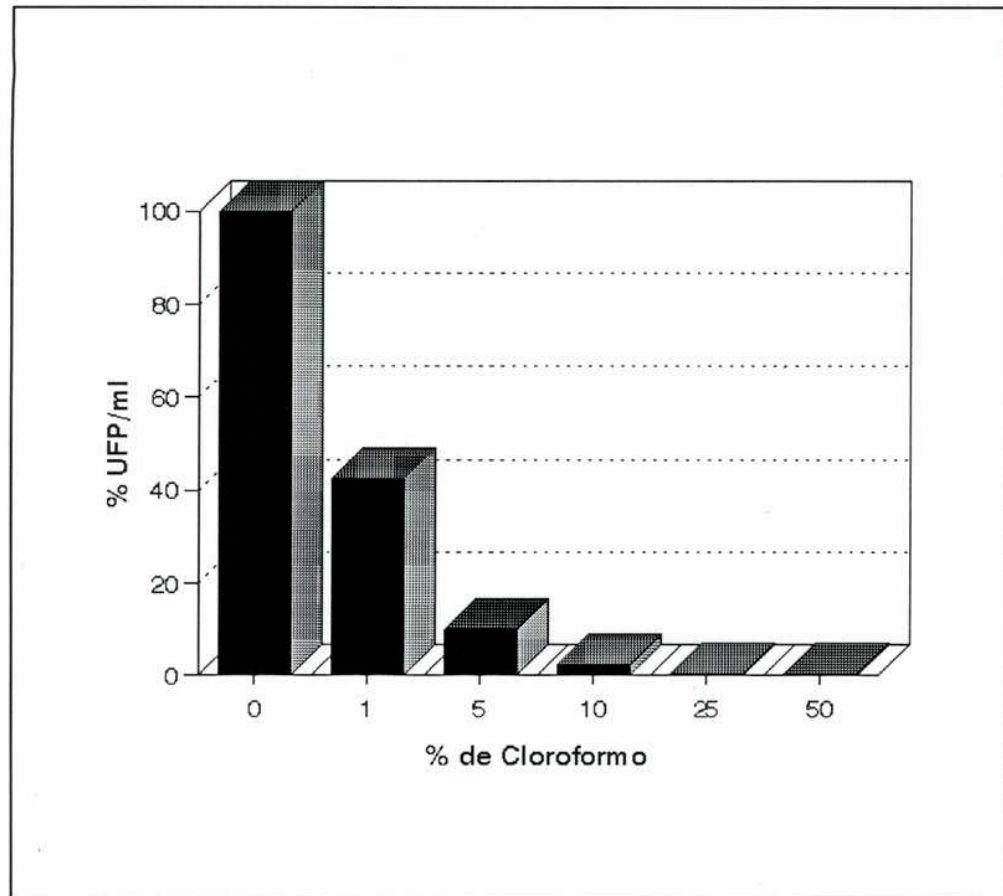
Sensibilidad a solventes orgánicos

Esta propiedad fue ensayada solamente para dietil eter y para cloroformo, en especial para este último ya que se suele usar para matar las bacterias que puedan quedar en el sobrenadante luego de la centrifugación del lisado crudo.

Luego del tratamiento con dietil eter, la suspensión de fagos mantuvo el 90 % del título de la suspensión sin tratar, indicando que Kvp1 no es sensible a este solvente. Sin embargo el cloroformo en las mismas condiciones de ensayo inactivó casi el 100 % de los fagos infectivos respecto de la suspensión sin tratar. Para ensayar si este solvente puede ser o no utilizado para conservar una suspensión de fagos libre de bacterias se ensayó la sensibilidad de Kvp1 a distintos porcentajes de cloroformo en medio LB. La figura 26 muestra que aún con pequeñas concentraciones de cloroformo (suficientes para matar las células presentes luego de la centrifugación del lisado crudo) la pérdida del título es substancial.

Tradicionalmente se ha considerado la sensibilidad al cloroformo como indicativo de la presencia de lípidos en la partícula. Sin embargo se han descrito numerosos ejemplos de virus sensibles al cloroformo cuyas partículas no poseen lípidos (Ackermann et al, 1978). Este sería el caso de Kvp1 que por sus características generales pertenece a la familia *Podoviridae* cuyos miembros no poseen lípidos.

Figura N° 26: Sensibilidad de Kvp1 a distintas concentraciones de cloroformo



IV. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GENOMA DEL BACTERIOFAGO Kvp1 Y RELACIONES FILOGENETICAS

Análisis parcial de la secuencia nucleotídica del genoma de Kvp1

Para efectuar este análisis se construyeron dos bibliotecas del genoma Kvp1. Estas fueron denominadas Alu y Hae según las enzimas de restricción utilizadas para cortar el ADN del fago. Se tomaron clones al azar y se secuenciaron por el método de Sanger et al, (1977). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de bacteriófagos y secuencias bacterianas contenidas en bancos de datos de secuencias (EMBL y GENE BANK) mediante el programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988) vía correo electrónico y el programa Cyborg Ver 1.8 (IBI/Plustel Sequence Analysis Programs), también se utilizaron algunas herramientas del programa DNASIS Ver 3 (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.).

Los resultados de este análisis se pueden observar en las páginas 97 a 120, donde las secuencias están ordenadas por su homología con secuencias del fago T7 de acuerdo a la numeración propuesta por Dunn & Studier, 1983 para los genes de este fago.

Todos los fragmentos presentan homología con secuencias del genoma de T7 y en la mayoría de los casos también con los fagos T3, K11 de *Klebsiella* y SP6 de *Salmonella* para los cuales se encuentran disponibles datos de secuencias (MacGraw et al, 1985, Schmitt et al, 1987, Condreay et al, 1989, Yamada et al, 1986, Dietz et al, 1990, Kotani et al, 1987).

Algunos fragmentos clonados han sido secuenciados completamente (Alu7, Alu3, Alu6 y Hae9), en otros uno o sus dos extremos (nombrado con

la denominación del fragmento más la letra d o r según el extremo se haya secuenciado utilizando el "primer" directo o el "primer" reverso de M13 de acuerdo a lo indicado en materiales y métodos.

En algunos fragmentos se encontró homología con secuencias correspondientes a regiones regulatorias de los genomas de los fagos analizados (indicado en negrita), tales como sitios de reconocimiento para la RNAsaIII, sitios de unión al ribosoma (Shine-Dalgarno), el codones de iniciación de la traducción y una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa viral (promotor).

Los fragmentos Hae4d, Hae4r, Hae3d, Hae3r, Alu12d, Hae5r, Alu13r, Alu3, Alu15r y Hae8r poseen homología con secuencias de los genomas de los fagos T7 y T3 (con K11 solo hay datos de la secuencia del gen 1), dichas secuencias corresponden a genes que codifican para proteínas con idéntica función. Es importante destacar que existe para T7 y T3 dentro de estos genes regiones con alta homología y regiones con homología parcial.

Para los fragmentos Alu6, Hae26d, Hae26r y Hae9 se muestran los resultados obtenidos en este análisis solamente para secuencias de genes del bacteriófago T7 dado que no hay datos de secuencias disponibles para los mismos genes de T3, sin embargo el análisis de heteroduplex entre T7 y T3 realizado por Hyman et al, 1974 muestra un alto grado de homología para esta región (genes 12, 15 y 16).

Los fragmentos Alu7 y ALu2r no muestran homología con T3 dado que el gen 0.7 del bacteriófago T7 con el cual posee homología estos fragmentos, no existe en el bacteriófago T3.

Resultados

ALU7

Pares de bases: 494

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: Final del gen 0.6 y gen 0.7

Proteína: Proteína quinasa (0,7)

% de homología: 75,7

```

              10      20      30      40      50
GTACCCCTGGCAGCACTCGAACAGCATTAAACAATACACTGAACAATCTTT-----
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  AAGAAACTCGCCGCACTTGAACAGGCACTAGCCAACACACTGAACGCTATCTCATAACGA
      1950      1960      1970      1980      1990      2000

              60      70      80      90      100      110
-CTTAAAGGACATAATCTAATGAACTACACCGACATTCAGGCACG-TCTGGCAATCATCA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  ACATAAAGGACACAATGCAATGAACATTACCGACA-TCATGAACGCTATCGACGCAATCA
      2010      2020      2030      2040      2050      2060

              120     130     140     150     160
AGTCACTCCCGATTAGCGAACTGGACAAGCG-CCAGCCAT-CTTACTGGTTGCACTGGCT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  AAGCACTGCCAATCTGTGAACTTGACAAGCGTCAAGGTATGCTTA-----TCGACTTACT
      2070      2080      2090      2100      2110

170      180      190      200      210      220
GCT-GACATCGTGAACGGTGAGACAAGCGATGG---GCAAACGCAACTAAATCGACGG-T
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  GGTGAGATGGTCAACAGCGAGACGTGTGATGGCGAGCTAACGCAACTAAATC-A-GGCA
      2120      2130      2140      2150      2160      2170

              230     240     250     260     270     280
CTGGAGCATTCAAGACTGGTGGCACACGTTGGCGCGCACTCATGCGTGATGCTGGATTCA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  CTTGAGCA-TCAAGATTGGTGGACTACCTTGAAGTG-TCTCACGGCTGACGCAGGGTTCA
      2180      2190      2200      2210      2220      2230

              290     300     310     320     330     340
AGATGTTACGGCAATGGTCACTTTCAGTGCAGGCTACTTCGCACGAAATGTTACCGGGTCC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  AGATGCT-CGGTAATGGTCACTTCTCGGCTGCTTA-TAGTACCCGCTGCTACCTAACAG
      2240      2250      2260      2270      2280

              350     360     370     380     390     400
AGTCATTAAGGTTGGCTTTAAGAAAGAGGAATTCAGGCGCTGCATACACTGCATTCTGTA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  AGTGATTAAGGTTGGGCTTTAAGAAAGAGG-ATTCAGGCGCAGCCTATACCGCATTCTGCC
2290      2300      2310      2320      2330      2340

              410     420     430     440     450     460
GGATGCACCAAGGTTCGAGCGGGTAT-CATAACGTCTATCACGTAGCACGTCATGCAGGTT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  GCATGTATCAGGGTCGTCCGTATCCCTAACGTCTACGATGTACAGCGCCACGCTGGAT
2350      2360      2370      2380      2390      2400

```

Resultados

```
          470          480          490
      GCTATACGGTCGTACTGGAC-CGCTTAAAAAGG
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7    GCTATACGGTGGTACTTGACGCACTTAAGGATT
      2410      2420      2430      2440
```


ALU2

Pares de bases: 97

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 0,7

Proteína: Proteína quinasa

% de homología: 66,7

```

          10      20      30      40      50
          CTTGTTGTCTATGTAGATTGATTAAGGCTCATCAAGGTAGTCGATGGA-GTTCTTCGTG
          |  ||  ||  |  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
T7       CGCATTTCAGCATCGACCCT-GAGGAA--CTCATCAAGGAAGTCGA-GGAAGTCGCACG-A
          2700      2710      2720      2730      2740

          60      70      80      90
          AAGTNNNNNNNCCATCCAC-CTAT-GGNNNTGGTTATGAC
          || ::::::: | || | || | ||::: || | ||
T7       CAGAAAGAAATTGA-CCGCGCTAA-GGCC--GTAAAGAA
          2750      2760      2770      2780
```

Resultados

HAE4D

Pares de bases: 306

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: Comienzo del gen 1, parte del sitio RI de reconocimiento de la RNasa III

Proteína: ARN polimerasa

% de homología: 72,6

```

      10      20      30      40      50
CCTTCATAGATAAACCTTTCTTAAC--AACGAGGCAC-ACATGAACGTAATCAACGCACC
||| ||||| | | ||| ||||| | ||||| | ||||| | ||||| | ||||| |
T7 CCTGAATAGGT-ACGATTTACTAACTGGAAGAGGCACATAATGAACACGATTAACATCGC
      3140      3150      3160      3170      3180      3190

      60      70      80      90      100      110
AAAGAATGACTTCTCTGACATCG--CTAAC-GCAATCCAGCCGTACCAACCATTCTGGCT
||||| ||||| ||||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7 TAAGAACGACTTCTCTGACATCGAACTGGCTGCTATC---CCGTTC-AA-CACTCTGGCT
      3200      3210      3220      3230      3240

      120      130      140      150      160
GACCGTTACGTGCACAGCTTCAGCT-ACGCAGCTTAAG---TTGA-CATAAG-CGCACAC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
T7 GACCATTACGGTGAGCG-TTTAGCTCGGAACAGTTGGCCCTTGAGCATGAGTCTTACGA
      3250      3260      3270      3280      3290      3300

      170      180      190      200      210      220
TAAGGGCGAAGAAACGCAGTTTACCTTAAGGCAATGGAGCCGTAATCAAAGCTGGTGA
| ||| ||||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7 GATGGGTGAAG-CACGC----TT--CGCAAGATGTTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGA
      3310      3320      3330      3340      3350

      230      240      250      260      270      280
-GTTCCGGTAATAA-GCAGTGGCTAACCGGTCCTGTCATCGTGGACAGTCATCGACTGGC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
T7 GGTTGCGG--ATAACGCTGCCGCCAA---G-CCTCTCATC-ACTACCCTACTC-TCTAAG
3360      3370      3380      3390      3400      3410

      290      300
CTTGGTTCACCGGTGACACT
| | ||| ||| ||| |||
T7 ATGATTGCACGCATCA-ACG
      3420      3430
```

Resultados

HAE4D

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: Comienzo del gen 1

Proteína: ARN polimerasa, parte del sitio de reconocimiento de la RNasa III

% de homología: 73,4

Nota: la numeración de bases no corresponden a la ubicación del gen en el genoma de T3, sino la numeración dada por McGraw et al, 1986 al secuenciar el gen

```

      10      20      30      40      50
CCTTCATAGATAAACCTTTCTTAACAACGAGGCACAC-ATGAACGTAATC-AACGCACC-
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 CCTGAATAG-GAACGATTTATTCAACAATGAGGTAAGCAATGAACATCATCGAAAACATCG
      110      120      130      140      150      160

      60      70      80      90      100      110
-AAAGAATGACTTCTCTGACATCG--CTAAC-GCAATCCAGCCGTACCAACCATTCTGGC
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 AAAAGAATGACTTCTCAGAAATCGAACTGGCTGCTATC---CCGTTC-AA-CACACTGGC
      170      180      190      200      210

      120      130      140      150      160
TGACCGTTACGTGCACAGCTTACGCTACGCAGCTTAAGTTGACATAAGCGCA-CA--C-T
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 TGACCACTACG-GAAGCGCCTTGGCTAAAGAGC--AGTTGGCTTTAGAACATGAGTCTT
      220      230      240      250      260      270

      170      180      190      200      210      220
AAGGGCGAAG-AAACGCAGTTTACCTTAAGGCAATGGAGCCGTAATCAAAGCTGGTGA
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 ATGAGCTAGGCGAGCGCCGCTT--CCTCAAGATGCTTGAGCGTCAAGCGAAAGCTGGTGA
      280      290      300      310      320      330

      230      240      250      260      270      280
GTTCCGGTAATAAGCAGTGGCTAACCGGTCCTGTCATCGTGGACAGTCATCGACTGGCCT
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 GATTGCAGACAACGCAGCCGCTAAGCCGT--T-AC-TCG-CTAC-G-C-T--TCTC-CCT
      340      350      360      370      380

      290      300
TGGTTCACCGGT-GACACT
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3 AAGTTAACCACACGTATCG
      390      400
```

Resultados

HAE4D

Homología con: Genoma del bacteriófago K11 de *Klebsiella* sp.

Gen: Comienzo del gen 1

Proteína: ARN polimerasa, parte del sitio RI de reconocimiento de la RNasa III

% de homología: 66,0

Nota: la numeración de bases no corresponden a la ubicación del gen en el genoma de K11, sino la numeración dada por Dietz et al, 1990 al secuenciar el gen

```

      10      20      30      40      50
CCTTCATAGATAAACCTTTCTTAACAACGAGGCACAC-ATGAACGTAATCAACGCACCAA
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CACCCATAGATAAA-CTTTATCCACAAAGAGGCACACAATGAACGCATTAAACATTGGAC
      40      50      60      70      80      90

      60      70      80      90      100     110
AGAATGACTTCTCTGACATCGCTAACGCAATCCAGCCGTACCAACCATTCTGGCTGACCG
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 GTAATGACTTCTCCGAGATTGAACTTGCTGCTATTCCGTAC-AA-CATCCTGAGCGAGCA
      100     110     120     130     140     150

      120     130     140     150     160     170
TTACGTGCAC--AGCTTCAGCTACGCAGCTTA--AGTTGA-CATAAGCGCACACTAAGGG
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CTACGGGACCAAGCGGCACGTGAGCAG-TTAGCACTGGAGCATGAG-GCATACGAGCTT
      160     170     180     190     200     210

      180     190     200     210     220     230
CGAAGA-AACGCAGTTTTACCTTAAGGCAATGGAGCCGTAATCAAAGCTGGTGAGTTCC
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 GGCAGACAACG----TTT-CCTGAAGATGTTAGAACGTCAGGTGAAAGCTGGTGAGTTCC
      220     230     240     250     260

      240     250     260     270     280     290
GGTAATAAGCAGTGGCTAA-CCGGTCCTGTCATCGTGGACAGTCATCGACTGGCCTTGGT
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CTGACAACGCGGCCGCTAAGCCGCTGGTCTTAACGTTG-CACCCA-CAGCTGACCAAGCG
      270     280     290     300     310     320

      300
TCACCGGTGACACT
|  | | | | |
K11 -CATTGACGACTGG
      330
```

Resultados

HAE4R

Pares de bases: 230

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 1

Proteína: ARN polimerasa

% de homología: 71,6

```

          10      20      30      40      50
CTGA-GCG-TACACAGTATATGATATTGCCTTAGAGGGATA-TCAGCGGTGAACAGCGCA
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  CTGATGCGCTACGAAG-ACGTTTACATGCCT--GAGGTGTACAAAGCGATTAACATTGCG
      4090      4100      4110      4120      4130

          60      70      80      90      100     110
CAGAATACGCCTTGGAAAGGATTTAACAAGAAGTTCTGGCAGGTGGTCAACGAGATTGTG
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  CAAAACACCGCATGGAA--AATCAACAAGAAAGTCTTAGC-GGTCGCCAACGTAATCACC
4140      4150      4160      4170      4180      4190

          120     130     140     150     160     170
AACTGGAAGCA-TGCCCGGTTGAAGATGTTCTGCTCTGGAGCGAGGGGAACTACC--TG
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  AAGTGAAGCATTGTCCGGTCGAGGACATCCCTGCGATTGAGCGTGAAGAACTCCCGATG
4200      4210      4220      4230      4240      4250

          180     190     200     210     220     230
CAAACCTGAAGACATCGACACGAACGAAGCGGCGCTTAAATCGTGAAGAAAGCGG
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  -AAACCGGAAGACATCGACATGAATCCTGAGGCTCTCACCGCGTGAAACGTGCTG
4260      4270      4280      4290      4300      4310
```

Resultados

HAE4R

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 1

Proteína: ARN polimerasa

% de homología: 74,8

Nota: la numeración de bases no corresponden a la ubicación del gen en el genoma de T3, sino la numeración dada por McGraw et al, 1986 al secuenciar el gen

```

          10      20      30      40      50
C-TGA-GCGTACACAGTATATGATA-TTGCCTTAGAGGGATATCA-GCGGTGAACAGCGCACA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 CTTGATGCG-CTACGAAGACGTTTACATGCC--AGAAGTCTACAAGGCTGTGAACCTCGCGCA
   1060      1070      1080      1090      1100      1110

          60      70      80      90      100      110
GAATACGCCCTTGGAAAGGATTTAACAAGAAGGTTCTGGCAGGTGGTCAACGAGATTGTGAA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 AAACACCGCATGGAA--AATCAACAAGAAAGTTCTTGC-TGTTGTCAATGAGATTGTTAA
   1120      1130      1140      1150      1160      1170

        120      130      140      150      160      170
CTGGAAGCA-TGCCCGGTTGAAGATGTTCTGCTCTGGAGCGAGGGGAACTACCTGC-AA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 CTGGAAGAATTGCCCGGTAGCAGACATTCCATCGCTGGAGCGCCAAGAGTTACCGCCTAA
   1180      1190      1200      1210      1220      1230

        180      190      200      210      220      230
ACCTGAAGACATCGACACGAACGAAGCGGCGCTTAAATCGTGAAGAAAAGCGG
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 GCCTGACGACATTGACACCAACGAGGCAGCGCTCAAGGAGTGAAGAAAAGCGG
   1240      1250      1260      1270      1280
```

Resultados

HAE4R

Homología con: Genoma del bacteriófago K11 de *Klebsiella* sp.

Gen: 1

Proteína: ARN polimerasa

% de homología: 73,6

Nota: la numeración de bases no corresponden a la ubicación del gen en el genoma de K11, sino la numeración dada por Dietz et al, 1990 al secuenciar el gen

```

          10      20      30      40      50
CTGAG-CG-TACACAGTATATGATATTGCCTTAGAGGGATATCA-GCGGTGAACAGCGCACAA
||| | | | ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CTGCGCCGCTAC-GCTGACGTGCACATGCC--AGAGGTATAACAAGGCGGTAAACCTCGCGCA
    1060      1070      1080      1090      1100      1110

          60      70      80      90      100      110
GAATACGCCTTGGAAGGATTTAACAAGAAGGTTCTGGCAGGTGGTCAACGAGATTGTGAA
|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 AAACACGCCCGTGGAAGG--TGAACAAGAAGGTGCTGGC-GGTAGTCAACGAGATTGTCAA
    1120      1130      1140      1150      1160

          120      130      140      150      160      170
CTGGAAGCA-TGCCCGGTTGAAGATGTTCTGCTCTGGAGCGAGGGGAACTACCTGC-AA
|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CTGGAAGCACTGCCCGGTAGGTGACGTCCCAGCGATTGAACGCGAAGAGTTACCGCCGCG
    1170      1180      1190      1200      1210      1220

          180      190      200      210      220      230
ACCTGAAGACATCGACACGAACGAAGCGGCGCTTAAATCGTGGAAAGAAAGCGG
|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
K11 CCCGGACGATATTGACACCAACGAGGTGGCACGTAAGGCATGGCGCAAGGAGG
    1230      1240      1250      1260      1270      1280
```

Resultados

HAE3D

Pares de bases: 199

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: Principio del gen 1.3 y sitio de reconocimiento R 1.3 para la RNasa III

Proteína: ADN ligasa

% de homología: 76,9

```

          10      20      30      40      50
CCCTTGATACCTTTGATTACT-A-TTAACCACACACAAAGGAGGT-TCCATCATGGAAATAA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  CTCTCTAGGAGTGGCCTTAGTCATTTAACCA-----ATAGGAGATAAACATTATG--ATGAA
      6430      6440      6450      6460      6470      6480

          60      70      80      90      100      110
CATTCAAGACTAACCATTCAAGCAGTATC-CACGTTGAGTCTGCCATTAAGAAAGCAC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  CATT-AAGACTAACCCTTTAAAGCCGTGTCTTTCGTAGAGTCTGCCATTAAGAAGGCTC
      6490      6500      6510      6520      6530      6540

          120      130      140      150      160      170
TCGAACAAGGCTGGCTACCTGATTGCTGACACTAAGCATGATGGTGTACGTGGTAACATC
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  T-GGATAACGCTGGGTATCTTATCGCTGAAATCAAGTACGATGGTGTACGCGGGAACATC
      6550      6560      6570      6580      6590      6600

          180      190
CTGGTTGACAATACGGCTGAC
| | | | | | | | | | | | | | | |
T7  TGCGTAGACAATACTGCTAAC
      6610      6620
```


HAE43D

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: Principio del gen 1.3 y sitio de reconocimiento de la RNasa III

Proteína: ADN ligasa

% de homología: 78,6

```

          10      20      30      40      50
    CCCTT-GTATACTTT-GATTACT-ATTAACCA-CACACAAAGGAGGTCCATC--ATGGA
    ||||| ||| | ||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3  GCCTTCGT-GA--TTCGA--ACTGATTAACTTTCAAACA-ATGAGGAACAACCGTATG--
    3710      3720      3730      3740      3750

          60      70      80      90      100      110
    AATAACATTCAAGACTAACCATTCAAAGCAGTATC-CACGTTGAGTCTGCCATTAAGAA
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
T3  AACATC-TTCAATACCAACCATTCAAAGCTGTGTCATTCGTAGAGTCTGCCGTTAAGAA
    3760      3770      3780      3790      3800      3810

          120      130      140      150      160      170
    AGCACTCGAACAAGGCTGGCTACCTGATTGCTGACACTAAGCATGATGGTGTACGTGGTA
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
T3  AGCGCT-GGAGACCTCCGGCTATCTTATAGCGGATTGTAAATATGATGGCGTGC GCGGTA
    3820      3830      3840      3850      3860      3870

          180      190
    ACATCCTGGTTGACAATACGGCTGAC
    ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
T3  ACATTGTGGTTGATAACGTGGCTGAG
    3880      3890      3900

```

HAE3R

Pares de bases: 44

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 1.3

Proteína: ADN ligasa

% de homología: 79,1

```
          10      20      30      40
          GCTGATTTTCCTGATGGCTTTATGCTGGATGGNCAACTCATGGT
          ||| |
T7      GCTTCTACAAA-GATGGCTTTATGCTTGATGGGGAACTCATGGT
          6720      6730      6740      6750      6760
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 1.3

Proteína: ADN ligasa

% de homología:

```
          10      20      30      40
          GCTGATTTTCCTGATGGCTTTATGCTGGATGGNCAACTCATGGT
          || || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T3      GCATCTTC-CCGGATGGCTTCATGCTGGATGGCGAACTGATGGT
          4010      4020      4030      4040
```

Resultados

ALU12

Pares de bases: 147

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 2.5

Proteína: Proteína de unión al ADN de cadena simple

% de homología: 51,8

```

          10      20      30      40      50
          TGCTCAGCGTGCTCAGAGTCACTGCGATAATCTCGTGAGCGCTCATCTGCC-TTGCCTT
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T7      GGTTCACATAACAAGTGGAA-CACTGCTGTAGG-T-GCGAGCGTTAAGCTGCAACTGGAATC
          9640      9650      9660      9660      9670

          60      70      80      90      100     110
          C-TGGTGCTGGTCATACTTCATATAGGCATCCGCACCCATCTCAGCAAGTTTACCTACAG
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T7      CGTGATGCTGGTTCGAAGTGGCTACCTTTGGTGGCGGTGAAGACGATTGGGCTGACGA-AG
          9680      9690      9700      9710      9720      9730

          120     130     140
          TCCCAATCAGAGCGGACTTCTTGGCTAGG
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T7      TTG-AAG-AGAACGGCTATGTTGCCTCTG
          9740      9750      9760
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 2.5

Proteína: Proteína de unión al ADN de cadena simple

% de homología: 53,0

```

          10      20      30      40      50
          T-GCT-CAGCGTGCTCAGAGTCACTGCGATAATCTCGTGAGCGCTCA-TCTGCC-TTGTC
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T3      TCACTGGTGCCCTACAAGTGGAAACACCGCTGTGGGAGCAAGCG-TCAAGCTGCAACTGGA
          6530      6540      6550      6560      6570

          60      70      80      90      100     110
          CTTC-TGGTGCTGGTCATACTTCATATAGGCATCCGCACCCATCTCAGCA-AGTTTACCT
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T3      GTCCGTGATGCTGGTTCGAAGTGGCTACCTTCGG-CGGTGGCGGTGAAGATGAGTGGGCCG
          6580      6590      6600      6610      6620      6630

          120     130     140
          AC--AGTCCCAATCAGAGCGGACTTGG-CTAGGCTT
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T3      ATGAAG-TCGAAGATG-GTGG--TTACACTGCGAGT
          6640      6650      6660      6670
```

Resultados

HAE5

Pares de bases: 186

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 7.3 y 8

Proteína: Rango de huésped y Conector cabeza-cola

% de homología: 77,5

```

          10          20          30          40          50
TG-TGCCGCTGATCAGTA-GAGAAGCCCCGTGCTGGTGGTGGCAGAAGCTCTGAGTGT-AT
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  AGCCACCGC---TCCTTAGGAGAA-----CT-GT-ATGGAGTCAG-TCAATCAACCAT
      20150          20160          20170          20180

          60          70          80          90          100          110
GCTCGCAGTTCGTGCGGTGGTCTAACATTATAGGAGGCAC-T---ATGGCA-AGCTCACA
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  -AACGC-GA--ATACTACAGCGTAAGA-CAT-GGAGACACATTTAATGGCTGAGAA-AC-
20190          20200          20210          20230          20240          20250

          120          130          140          150          160
GAACGTGAAGGCTTTGCGGAGAATGGTGCCAAGGCTGTGTATGACGCA---TTGAA-GA-
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  GAACAGGA---CTT-GCGGAGGATGGCGC-AAAG-TCTGTCT-ATG-AGCGTTTAAAGAA
      20260          20270          20280          20290          20300

          170          180
CGACCGGAACTCC-TATGAG
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  CGACCGTG-CTCCCTATGAG
      20310          20320
```

Resultados

HAE5

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 7.3 y 8

Proteína: Rango de huésped y Conector cabeza-cola

% de homología: 72,0

```

          10      20      30      40      50
T3      TGTGCCG-CTGATCA-GTAGAGAAGCCCGTGGTGGTGGCAGAA-GCTCTGAGTGTAT
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
          CAAACCGAGAGCGCACGTAAGAAGGCCCGCGCTGGTGGT--AAGAAGGCACTTAGCGTA-
15160      15170      15180      15190      15200      15210

          60      70      80      90      100      110
T3      GCTCGCAGTTCGTGCGGTGGTCT-AACATTATAGGAGGCACT--ATGGCAAGCTCACAGA
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
          GCTCGCAGTTCGCGCGGTGGAATCAATATCTGAGGAGG-ACTGAATGGCTGATT--CAA
15220      15230      15240      15250      15260      15270

          120      130      140      150      160      170
T3      ACGTGAAGGCTTTGCGGAGAATGGTGCCAAGGCTGTGTATGA-CGCATTGAAGACGACCG
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
          ACGTACAGGATTGGGCGAAGACGGTGCTAAAGCTACCTATGACCGCCTAACAAACGACCG
15280      15290      15300      15310      15320      15330

          180
T3      GAACTCCTATGAG
          |  |||  |||  |||
          TAGAGCCTATGAG
15340
```

Resultados

ALU13

Pares de bases: 140

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 56,5

```

          10      20      30      40      50
CCTCGC-GTTACTGAGGGTGACTTCCTTCGAGAGTCTCAAGGTATCACCGAGAACTACCA
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7 TCTAACAGTTAC--CGCGTGACTCTCTTTGAGGCTCTCAAACAGTTAGTCGTAGCTGGTA
20610      20620      20630      20640      20650      20660

          60      70      80      90      100     110
ACATGACTACAGTGTTCATCTTAGGTAAGCTTTAGC-T--AACCGTGAGAATACCGT-AAG
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7 ACGTC-CTGCTGTACCTACC--GG-AACCGGAAGGGTCAAACATAT---AATCCCATGAAG
20670      20680      20690      20700      20710

          120     130     140
-TCAAATCAT-GAATAACAGTCCGATC
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7 CTGTACCGATTGTCTTCTTATGTGGTC
20720      20730      20740
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 58,2

```

          10      20      30      40      50
CCTCG--C-GTTACTGAGGGTGACTTCCTTCGAGAGTCTCAAGGTAT-CACCGAGAACTA
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 AATCCAACAGTTACCGCGTAACACT--CTTTGAGTGCCTCAAGCAGTTGATCGTGG-CTG
15630      15640      15650      15660      15670      15680

          60      70      80      90      100     110
CCAACATGACTACAGTGTTCATCTTAGGTAAGCTTTAGCTAACCGTGAGAATACCG-T-AA
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 GTAACGCC-CTGCTTTACTTACC--GG-AACCAGAAGGTAGC--TACAAAT-CCGATGAA
15690      15700      15710      15720      15730

          120     130     140
G-TCAAATCAT-GAATAACAGTCCGATC
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T3 GCTGTACCGATTGTCTTCTTATGTGGTC
15740      15750      15760
```

Resultados

ALU3

Pares de bases: 175

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 87,9

```

          10      20      30      40      50      60
CTATCGTCAAGATGTCCATGATTAGCTGCAAAGGTTATCGGCTTGGTTAACCCGGCTGGT
|||||
T7 CTATCGTCAAGATGTCCATGATTAGCT-CTAAGGTTATCGGCTTAGTGAATCCTGCTGGT
      21100      21110      21120      21130      21140      21150

          70      80      90      100     110     120
ATCACACAGGTTTCGTCGCTTAACGAAAGCACAAACAGGTGACTTTGTGTCTGGTCGTCCA
|||||
T7 ATCACCCAGCCACGCCGACTGACCAAAGCTCAGACTGGTGACTTCGTTACTGGTCGTCCA
      21160      21170      21180      21190      21200      21210

          130     140     150     160     170
GAAGACATCTCGTTCCTTCAGTTGGAAAAGGCCGCTGACTTCTCTGTAGCGAAAG
|||||
T7 GAAGACATCTCGTTCCTTCCAAC TGGAGAAGCAAGCTGACTTTACTGTAGCTAAAG
      21220      21230      21240      21250      21260
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 75,3

```

          10      20      30      40      50      60
CTATCGTCAAGATGTCCATGATTAGCTGCAAAGGTTATCGGCTTGGTTAACCCGGCTGGT
|||||
T3 CTATCGTTAAGATGAGTATGATTAGC-GCGAAGGTCATTGGTCTGGTGAACCCGGCTGGC
      16120      16130      16140      16150      16160

          70      80      90      100     110     120
ATCACACAGGTTTCGTCGCTTAACGAAAGCACAAACAGGTGACTTTGTGTCTGGTCGTCCA
|| || |||
T3 ATTACGCAGCCCCGTAGATTAACCAAAGCTCAGACTGGTGACTTCGTTCCAGGCCGTCGA
16170      16180      16190      16200      16210      16220

          130     140     150     160     170
GAAGACATCTCGTTCCTTCAGTTGGAAAAGGCCGCTGACTTCTCTGTAGCGAAAG
|||||
T3 GAAGATATTGACTTCTGCAACTGGAGAAGCAAGCTGACTTTACCGTAGCGAAAG
16230      16240      16250      16260      16270      16280
```

Resultados

ALU15

Pares de bases: 80

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: Final del gen 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 68,6

```

                10          20          30          40          50
TG-CTCTG-NANAAC-G-CT-TGCTGCATCTG-CTGN-TGCTGGTGCTGGTGCTCTGGCT
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  AGAAGATGGCCCAACAGTCTATGC-AAATGGGTATGGATAATGGTGCTGCTGCGCTGGCT
      21720      21730      21740      21750      21760

                60          70          80
ACTGCAAGCCCTG-AGAACACTGAAAGG
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T7  CAAGGTATGGCTGCACAAG-CTACAGCT
21770      21780      21790
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: Final del gen 8

Proteína: Conector cabeza-cola

% de homología: 81,9

```

                10          20          30          40          50
TGC-TCTGNANAACGCTTGCTGCATCTGCTGNTGCTGGTGCTGGTGCTCTGGCTACTGCA
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T3  GCGTC-G-AGAATGC-TGCGGCTGCTGGTGCTGGTGCTGGTGCTTTGGCTACCTCA
      16760      16770      16780      16790      16800      16810

                60          70          80
AGCCCTGAGAACACTGAAAGG
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
T3  AGTCCAGA-AGCCATGCAAGG
      16820      16830
```


Resultados

HAE26D

Pares de bases: 105

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 12

Proteína: Proteína de la cola

% de homología: 66,3

```

          10      20      30      40      50      60
ACGAAAACAATCGGTGATGCTAGGAATCCTAGGTGGCGCACCATTAGTCCACCTGAATAA
  || ||| | ||| | | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
T7  TTAATACACTTGGAGACAAC-GGTGCGTTAGGTCAAGCTCCGTACATCCACCTGATTAA
          25000    25010    25020    25030    25040    25050

          70      80      90      100
CCGCGATAGTATCGAACAGTATTACGTTGTGTTCACTGGAAGTGG
  ||| ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| | ||| |
T7  CCGAGATGAGCACGAACAGTATTACGCTGTGTTCACTGGTAGCGG
          25060    25070    25080    25090
```

Resultados

HAE26R

Pares de bases: 129

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 12

Proteína: Proteína de la cola

% de homología: 71,7

```
          10      20      30      40      50
ACAATGATGACACCTACGAGAC-AGTAAT-ATACCCGGTCAGTTCTACGGAATG-AAGAC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
T7  ACAACGATGACACATTCACCTACCTCTATTCATATTCCAACA-ATTTATGG--TGCAA-A-
          26670      26680      26690      26700      26710
```

```
          60      70      80      90      100      110
CT--ATCA-TGGT-AAGT-ATTAGATCGTGCGATGGATGGTAAGGTGACGTGGTTTGATGA
||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  CTTCGGGAGGGGCAAATCACTGTATTG-GAGCCTGATGGTAAGATAACCGTGGTTTGAGCA
26720      26730      26740      26750      26760      26770
```

```
          120
GCCTCAAGGC-GGCTGG
||| | | | | | | |
T7  ACCT-ACGGCTGGGTGG
          26780      26790
```

Resultados

ALU6

Pares de bases: 330

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: Final del gen 15 y principio del 16

Proteína: Ambos genes codifican para proteínas internas de la partícula

% de homología: 71,7

```

          10      20      30      40      50
GCCAAGAA-CCTAATGCCTTCTGGTAGCATGTACGATTC---GGTAAGTGGTAAA-GGT
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  GCTACGAAGGCCCG-TGAAG-CTGCT-GC-TAAACGAGTCCGAGAGAAA-CGTAAACAGA
      30490      30500      30510      30520      30530

          60      70      80      90      100
ATTCT--GGACACTCCT--GACTGGTAAAGACTAAC---AGACCAGGATAGGAGGTTCCA
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  CTCCTAAGTTCA-TCTACGGAC--GTAAGGAGTAACTAAAGGCTACATAAGGAGGCCCTA
30540      30550      30560      30570      30580      30590

110      120      130      140      150      160
AATGGATAAGTATAACCGGAACGAATCGCATGAATATGATGCGTTATTTCAACAAGC-GC
||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  AATGGATAAGTACGATAAGAACGTACCAAGTGATTATGATGGTCTGTTCCAAAAGGCTGC
      30600      30610      30620      30630      30640      30650

170      180      190      200      210      220
TGACACACATGGAGTCTCCTATGGCCTTCTTCGGAAGGTCGGTTGGGTAGAGTCCCGATT
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  TGATGCCAACGGGGTCTCTTATGACCTTTTACGTAAGTTCGCTTGGACAGAATCACGATT
      30660      30670      30680      30690      30700      30710

230      240      250      260      270      280
CAATCCGAAACCTCAATCCAAAACCGGGCCACGAGGTGTCATGCAGTTCACTAAGGC-AC
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  TGTGCCTACAGCAAATCTAAGACTGGACCATTAGGCATGATGCAATTTACCAAGGCAAC
      30720      30730      30740      30750      30760      30770

290      300      310      320      330
TGGTCAGGCTTATGG-CTAC-AGTCT--GATGAGGACTTCAGCGACCG
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
T7  CGCTAAGGCCCTCGGTCTGCGAGTTACCGATG-GTCCAG-A-CGAC-G
      30780      30790      30800      30810
```

Resultados

HAE9

Pares de bases: 340

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 16

Proteína: Proteína interna de la partícula

% de homología: 76,4

```

                10      20      30      40      50
                CGGCTGGATCTATTGACGCTGGCGCTCGCTACCTTGCAGACCTGTTAAG--AG-TACATG
                |||
T7 30830      30840      30850      30860      30870      30880
                CTGAGTTAGCTATTAATGCTGCCGCTAAGCAACTTGCAGGTCTGGTAGGGAAGTTTGATG
                |||
                60      70      80      90      100      110
                GTGACGAA-T-AAAGCTGCCCTAGCGTACA--C-AGGTGAGGGACGTGACGGCAA-CT-C
                |||
T7 30890      30900      30910      30920      30930      30940
                GCGATGAACTCAAAGCTGCCCTTGCGTACAACCAAGGCGAGGGACGCTTGGGTAATCCAC
                |||
                120      130      140      150      160
                A--TTGGA-GCCTACGACT-CCGGTAACTTTGCCAGCATCGGTGATGAGGGGCGCAACTA
                |||
T7 30950      30960      30970      30980      30990      31000
                AACTT-GAGGCGTAC-TCTAAGGGAGACTTCGCATCAATCTCTGAGGAGGGACGTAACTA
                |||
                170      180      190      200      210      220
                TCTCCGCTCACTTCTGGATGTCGCTAAGTCACCGAGTGG--GGACA-TT-GAGTCATTCG
                |||
T7 31010      31020      31030      31040      31050      31060
                CATGCGTAACCTTCTGGATGTTGCTAAGTCACCTA-TGGCTGGACAGTTGGAACCTTTTG
                |||
                230      240      250      260      270      280
                GTGGTATCACCCCAAAGGCTAAAGGGATTCCGTTTGATGCTGCGATGAGTGGTATCGGGA
                |||
T7 31070      31080      31090      31100      31110      31120
                GTGGCATAACCCCAAAGGGTAAAGGCATTCCGGCTGAGGTAGGATTGGCTGGAATTGGTC
                |||
                290      300      310      320      330      340
                AGAAAGGAAAGGTAACAACGAAC-TCCTGAGTCTCACTCAATGTCTTTTCAGGTAAGAC
                |||
T7 31130      31140      31150      31160      31170      31180
                ACAAGCAGAAAGTAACACAGGAACTTCCTGAGTC-CAC--AA-GTTTTGACGTTAAGGG
                |||
```

HAE8

Pares de bases: 50

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Gen: 19

Proteína: empaquetamiento del ADN viral

% de homología: 69,4

```

                10      20      30      40      50
AAACAAAATGCGCTCATCGTGGCGCAACTTAACCCTCAACTCGCTGGG
  ||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T7  CAATCGTAATGCGCTCGTAGTGGCGCAACTGAAAGGAGA-CTTCG-TGGC
    37390    37400    37410    37420    37430
  
```

Homología con: Genoma del bacteriófago T3

Gen: 19

Proteína: Empaquetamiento del ADN viral

% de homología: 69,4

Nota: La numeración de bases corresponde a la ubicación a partir del extremo derecho del genoma de T3 en el segmento secuenciado por Yamada et al, 1986.

```

                10      20      30      40      50
AAACAAAATGCGCTCATCGTGGCGCAACTTAACCCTCAACTCGCTGGG
  ||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
T3  CAATCGTAATGCGCTCGTAGTGGCGCAACTGAAAGGAGA-CTTCG-TGGC
    2870    2880    2890    2900    2910
  
```

Otro fragmento secuenciado, HaeI, posee una zona de alta homología con el bacteriófago T7 seguido de una zona de baja homología, la primera zona corresponde al promotor ϕ 4.7, del genoma del fago T7, que en Kvp1 solo difiere en una base; la segunda zona corresponde al principio del gen 4.7 en donde la homología a partir del codon de iniciación (indicado en negrita) es de 35,2 %. Teniendo en cuenta que en el bacteriófago T7 la función de este gen no se ha determinado y no es esencial en el programa de replicación, este hecho podría tener dos posibles explicaciones: 1) las mutaciones acumuladas en el gen 4.7 de Kvp1 no afectan selectivamente la funcionalidad de este gen o 2) el gen 4.7 no existe en Kvp1 pero si el promotor, ya que en T7 la ARN polimerasa viral reconoce este promotor y transcribe además del gen 4.7 los genes 5, 5.3, 5.5, 5.7 y 6, este último codifica para la ADN polimerasa viral.

HAEI

Pares de bases: 100

Homología con: Genoma del bacteriófago T7

Promotor ϕ 4.7

Nota: Promotor y parte del sitio R 4.7 de reconocimiento de la RNAasa III y principio del gen 4.7.

```

                10         20         30         40         50
CCTTTTTTCGTTTCTATTTCGACTCACTAT-GGAGGAACAACCTCATGCTATTTCTATT--
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  GCCTTCATGAATACTATTTCGACTCACTATAGGAGATATTACC--ATGCG-TGACCCTAAA
    13890      13900      13910      13920      13930      13940

                60         70         80         90         100
GTTGCTGTTATAGTTGCCACGTTTGCATTCGTT-AATAATTGA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
T7  GTTATCCAAGCAGAAATCGCTAAACTGGAAGCTGAACTGGAGG
    13950      13960      13970      13980

```

La tabla 4 resume los resultados de las comparaciones anteriormente realizadas. Como se puede observar los porcentajes de homología oscilan entre el 51 y 87 %

Existe además una correspondencia con la conservación de genes encontrada entre T7 y T3 dado que el grado de homología que existe entre T7 y T3 para los genes que aparecen en este análisis es similar al encontrado al comparar T7 o T3 con Kvp1 (por ejemplo entre T3 y T7, el gen 8 es muy conservado en su región terminal y el gen 2.5 posee baja homología, lo mismo fue observado al comparar Kvp1 con T7 y con T3).

Del análisis de las secuencias anteriores surge un mapeo de los fragmentos clonados por homología con el genoma de T7.

La figura siguiente esquematiza dicho mapeo distribuyendo, según los resultados obtenidos, los fragmentos clonados sobre el mapa del bacteriófago T7, de esta forma se puede asignar a cada fragmento una posible posición en el genoma del fago Kvp1.



Este esquema nos permite elegir algún fragmento y el sentido en el cual se debe seguir secuenciando para profundizar el análisis filogenético.

Tabla N° 4: Homología de los fragmentos clonados con los genomas de los fagos T7, T3 y K11.

Clon	Frag-mento	Porcentaje de homología			Gen	Proteína
		T7	T3	K11		
1	Alu7	76,0	NE	ND	0.7	Quinasa
2	Alu2r	66,7				
3	Hae4d	72,6	73,4	66,0	1	ARN polimerasa
	Hae4r	71,6	74,8	73,6		
4	Hae3d	76,9	78,6	ND	1.3	ADN ligasa
	Hae3r	79,0	79,0			
5	Alu12r	51,0	53,0	ND	2.5	Proteína de unión a ADN de cadena simple
6	Hae5r	77,5	72,0	ND	7.3 8	Rango de huesped, conector cabeza cola
7	Alu13r	56,5	58,2	ND	8	Conector cabeza cola
8	Alu3	87,9	75,3			
9	Alu15r	68,6	81,9			
10	Hae26d	66,3	ND	ND	12	Proteína de la cola
	Hae26r	71,7				
11	Alu6	71,7	ND	ND	15 16 16	Proteínas internas
12	Hae9	76,4				
13	Hae8r	69,4	69,4	ND	19	Proteína de empaquetamiento del ADN

NE: No existe. ND: No hay datos.

Mapeo por hibridación ADN-ADN de algunos fragmentos clonados

Para confirmar el mapeo por homología con secuencias del genoma de T7 que surge de los resultados obtenidos por el análisis computacional, se llevo a cabo un mapeo físico por hibridación ADN-ADN. Para ello el genoma del fago Kvp1 se digirió con distintas enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforésis en gel de agarosa. El ADN contenido en el gel se transferido a una membrana de nylon por la técnica de Southern, (1975), y se hibridó con una sonda radiactiva preparada a partir de algunos fragmentos clonados que presentaban homología con distintas regiones del genoma de T7.

Los fragmentos clonados elegidos para ser utilizados como sonda fueron los contenidos en el clon 1 (Alu7) y el clon 2 (Alu2), que presentan homología con distintas regiones del gen 0.7 que codifica para la proteína quinasa de T7 y el fragmento contenido en el clon 12 (Hae9) que presenta homología con un gen 16 que codifica para una proteína de la cola cuya ubicación en el genoma del bacteriófago T7 es distante a la del gen 0.7.

En la figura 27 se muestra el gel con las distintas digestiones del genoma de Kvp1, en la figura 28A la autorradiografía obtenida de la hibridación con el clon 1 (Alu7) que resultó ser idéntica a la obtenida al hibridar con el clon 2 (Alu2), y en la figura 28b la autorradiografía obtenida de la hibridación con el clon Hae9, la cual presenta un patron de bandas totalmente diferente.

Figura N° 27: Electroforesis de los fragmentos de restricción del genoma viral con distintas enzimas de restricción. Línea 0: ADN del fago Lambda digerido con Hind III usado como marcador de peso molecular, línea 1: ADN del fago sin digerir, línea 2 a 8: ADN del fago digerido con: 2 ClaI, 3 HaeIII, 4 HpaI, 5 NcoI, 6 NdeI, 7 NruI, 8 XbaI.

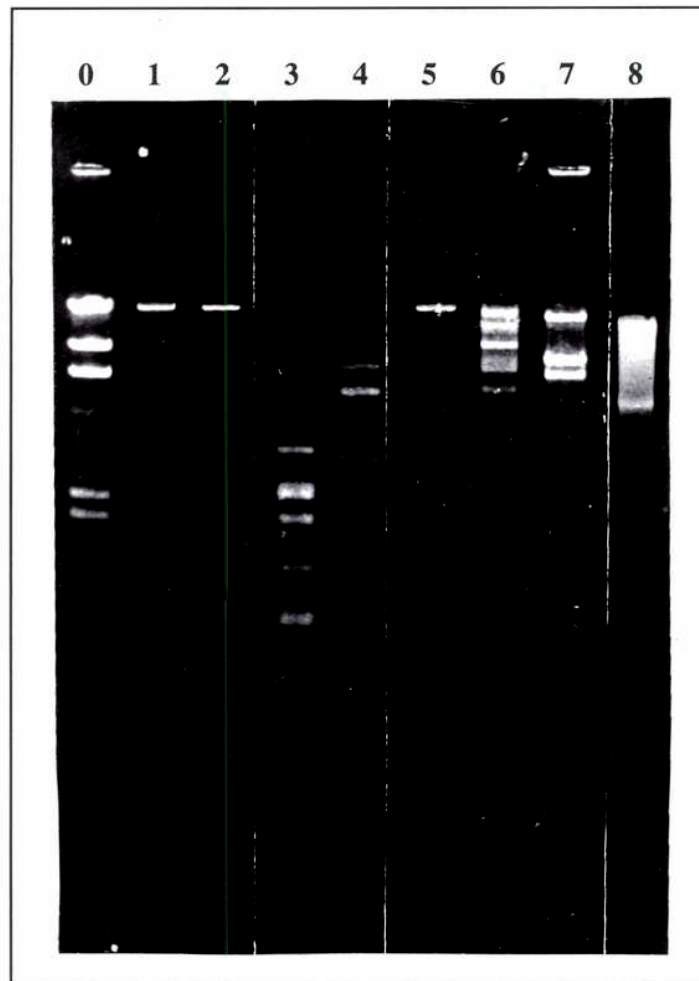


Figura N° 28A: Hibridación ADN-ADN con el fragmento Alu7.

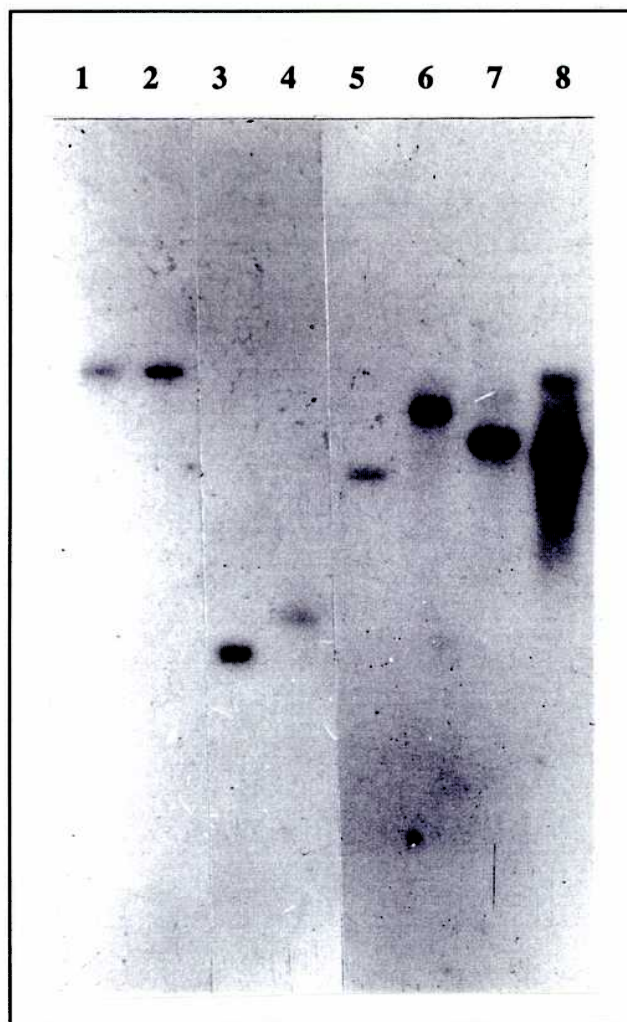
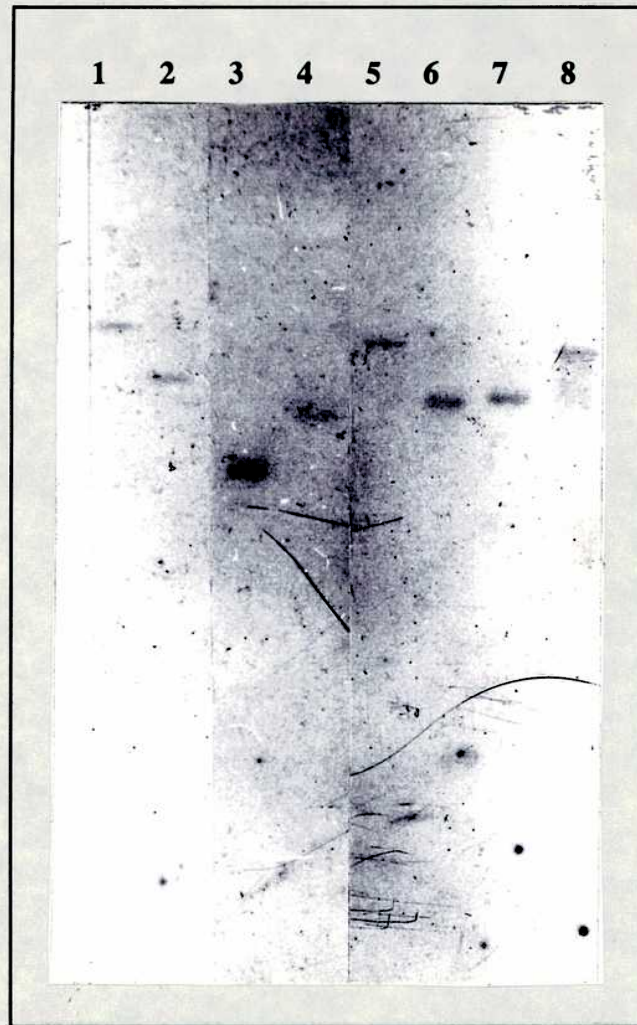


Figura N° 28B: Hibridación ADN-ADN con el fragmento Hae9.



Estos resultados confirman que las secuencias de fragmentos de clones que aparecen ligados por el análisis computacional (Alu7 y Alu2) son efectivamente vecinos en el genoma de Kvp1, ya que hibridan con el mismo fragmento en todas las digestiones. Por otro lado, un fragmento que mapea por homología con T7 en un gen alejado (Hae9) al de los fragmentos anteriores hibrida con fragmentos diferentes a los resultantes de las hibridaciones anteriores, en todas las digestiones.

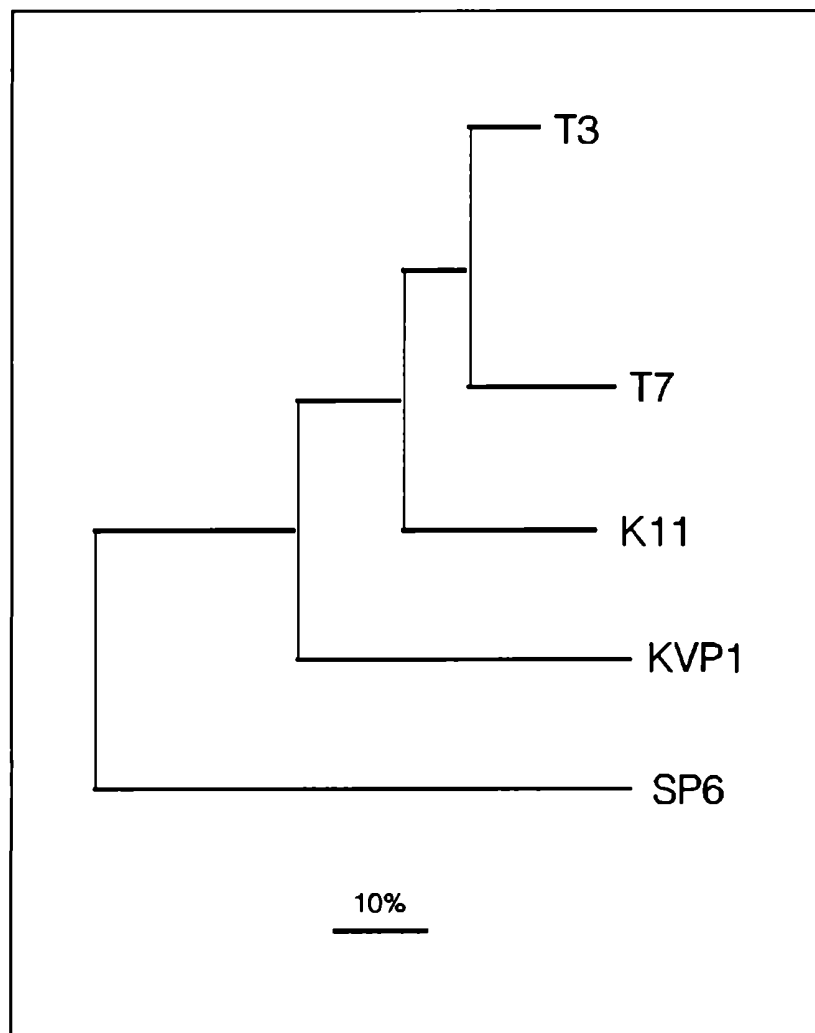
En resumen podemos decir que los genes del bacteriófago Kvp1 pueden ser homologados a los del fago T7 por presentar homologías en sus secuencias y poseer una organización genómica similar.

Arbol filogenético

Los fragmentos Hae4d y Hae4r presentan alta homología con la ARN polimerasa del fago T7, T3 y K11 (la homología es mucho menor con la ARN polimerasa del fago SP6 que también se encuentra secuenciada). Teniendo en cuenta la importancia de esta enzima, su presencia en todos los fagos relacionados a T7, su alto grado de conservación y el hecho que es el único gen cuya secuencia se encuentra disponible para otros fagos distintos de T3 y T7, se realizó un análisis filogenético utilizando el programa Clustal V (Higgins et al, 1991) que realiza múltiples alineamientos de secuencias para luego determinar las relaciones filogenéticas utilizando el método descrito por Saitou y Nei, (1987). La figura 29 presenta el árbol obtenido. Si bien la secuencia del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago SP6 no presenta un alto grado de homología con secuencias de T7, T3 K11 y el fago aquí descrito, igualmente se utilizó en este análisis

como "un representante filogenéticamente distante" dado que pertenece al grupo de fagos relacionados con T7.

Figura N° 29: Arbol filogenético. El tamaño de la barra corresponde a un 10% de divergencia



DISCUSSION

El alto grado de polución presente en el Riachuelo, hace que este sea un medio propicio para la selección de microorganismos con características peculiares relacionadas con su supervivencia en este medio. No es extraño entonces que los aislamientos de microorganismos que surjan del agua del Riachuelo no tengan precedentes y sean propios de este ambiente. Como parte del proyecto de estudio de la microflora presente en este curso de agua, en este trabajo se describe el aislamiento de una cepa bacteriana cuyas características bioquímicas encuadran sin ambigüedad dentro del género *Kluyvera*, un miembro de la familia *Enterobacteriaceae* muy poco estudiado.

Esta cepa de *Kluyvera* no es claramente identificable como ninguna de las dos especies definidas para el género dado que las características bioquímicas específicas de especie no son del todo coincidentes ni con *K. ascorbata* ni con *K. criocrescens*. La tabla 5 muestra las diferencias encontradas más dos características fenotípicas idiosincrásicas de la cepa 21, como son la morfología cerebroide de las colonias después de una incubación a 30° C por más de 48 horas y la sensibilidad al bacteriófago Kvp1 aquí aislado y caracterizado. Estas dos últimas podrían estar relacionadas teniendo en cuenta el hecho de que T7, T3, K11 y SP6 infectan solamente huéspedes rugosos (*E. coli* B , K12, en particular *Shigella* que solo es sensible a T7 en fase rugosa y no en fase lisa, *Klebsiella* y *Salmonella* respectivamente) (Lindberg, 1973).

Tabla N° 5: Características fenotípicas que permiten diferenciar a *K. ascorbata*, *K. criocrescens* y a la cepa 21.

Fenotipo	<i>K.</i> <i>ascorbata</i>	<i>K.</i> <i>criocrescens</i>	cepa 21
Crecimiento en medio con ascorbato	+	-	-
Fermentación de D-glucosa a 5°C (21 días)	-	+	+
Lisina decarboxilasa	+	-	+
Producción de gas en la fermentación de D-glucosa	+	+	-
Tamaño del halo en discos de cefalotina	menor de 17 mm	mayor de 17 mm	menor de 17 mm
Morfología cerebroide de las colonias	-	-	+
Sensibilidad al fago Kvp1	-	-	+

Por otro lado, paralelamente a este trabajo se secuenció el ARN ribosomal de *K. ascorbata*, *K. criocrescens* y la cepa 21. El análisis computacional de estas secuencias mostró que no existe una inclinación marcada que asocie preferencialmente a la cepa 21 con alguna de las dos especies definidas de este género (Pavan et al, en preparación). El conjunto estos resultados permiten sugerir a la cepa 21 como representante de un nueva

especie a la cual se ha propuesto el nombre de *Kluyvera fluvialis* (Gadaleta et al, en preparación).

Algunas de las propiedades de la cepa 21 pueden ser relevantes en cuanto a su supervivencia en un ambiente tan tóxico como el Riachuelo, en especial su resistencia a altas concentraciones de metales pesados, los cuales están presentes en este medio. La cepa 21 y probablemente cepas muy emparentadas con ella parecen estar establecidas en el Riachuelo, dado que de otra forma hubiera sido imposible el aislamiento de un fago específico como Kvp1 del agua del río y más aún de muestras tomadas en distintas estaciones de muestreo.

En cuanto al bacteriófago Kvp1, se han establecido las condiciones de replicación como así también analizado las características morfológicas, fisicoquímicas y biológicas más importantes (cuadro 1).

Cuadro N° 1: Características generales de Kvp1

<p>MORFOLOGIA: Fago icosaédrico de cola corta.</p> <p>TAMAÑO: 70 nm de diámetro.</p> <p>GENOMA: ADN lineal doble cadena de aproximadamente 40000 pares de bases, G+C aproximadamente 52,8 %.</p> <p>DENSIDAD DE FLOTACION EN GRADIENTE DE CICs: 1,517 g/cm³.</p> <p>CANTIDAD DE DNA Y PROTEINAS: 55 y 45 % respectivamente.</p> <p>PERIODO DE LATENCIA: 13 minutos.</p> <p>PERIODO DE ECLOSION: 10 minutos.</p> <p>PRODUCTIVIDAD: 30 fagos por célula infectada.</p> <p>PROTEINAS DE LA PARTICULA: Proteína mayoritaria de la cabeza de aproximadamente 36000 Daltons y por lo menos 9 proteínas más.</p> <p>REPLICACION: Adsorción a la pared bacteriana, infección virulenta, "shutoff" de la síntesis del huésped, degradación del genoma bacteriano.</p> <p>OTRAS: Parcialmente sensible al cloroformo.</p>

De acuerdo a estas, Kvp1 puede ser clasificado inequívocamente como perteneciente a la familia *Podoviridae* la cual agrupa un gran número de fagos con cola corta no contráctil cuyo genoma es ADN doble cadena. Muchos de estos fagos no han sido suficientemente estudiados en cuanto a sus relaciones filogenéticas, probablemente esta familia este compuesta por fagos que no están emparentados entre si. Sin embargo, se han aislado varios fagos estrechamente relacionados al bacteriófago T7, que constituyen el "Grupo T7". A este grupo pertenece Kvp1, dado que además de poseer características fenotípicas similares a los miembros del "Grupo T7", todos los fragmentos secuenciados de ADN de este bacteriófago muestran homología significativa con secuencias del genoma de los fagos T7, T3 y K11. En el caso de T3 y K11, para los cuales solo se dispone de datos de secuencias parciales, la homología encontrada con algunas regiones de sus genomas es mayor que con las correspondientes regiones en el fago T7.

Es interesante notar la alta conservación de la estructura de los promotores tardíos de T7, T3, SP6, K11 (Dunn & Studier, 1983, Mc Graw et al, 1984, Brown et al 1986 y Dietz et al, 1990) junto con la secuencia posiblemente promotora de Kvp1 (en **negrita** y **subrayadas** las bases consenso en los cinco fagos).

T7	TAAT <u>T</u> ACGACT <u>CACT</u> TAGGGAGA
T3	TAT <u>T</u> TACCCT <u>CACT</u> AAAGGGAAT
Kvp1	CTAT <u>T</u> TCGACT <u>CACT</u> AGGAGGAAC
K11	AAT <u>T</u> TAGGGC <u>CACT</u> TAGGGAAC
SP6	AAT <u>T</u> TAGGTG <u>CACT</u> TAGGAGA

Vemos que dentro de los 23 pares de bases que constituyen cada uno de los promotores de los genes de la región tardía, solo hay unas pocas diferencias. Estas son suficientes para determinar la baja o inexistente interacción heteróloga entre promotores y ARN polimerasas de estos fagos (Hausmann, 1988). Sin embargo, estas enzimas poseen una clara relación filogenética a juzgar por la homología encontrada entre sus genes.

En base al análisis computacional de las secuencias nucleotídicas del gen de la ARN polimerasa de T7, T3, K11, SP6 y Kvp1 se construyó el árbol filogenético que muestra la genealogía de estos fagos.

De la distribución de los fragmentos secuenciados sobre el genoma de T7 surge que T7, T3 y Kvp1 no difieren significativamente en su organización genómica.

Sin embargo, T7 posee algunos genes que no están presentes en T3 (como por ejemplo el gen que codifica para la proteína quinasa y el gen 0.3 que codifica para una proteína que inactiva las endonucleasas de restricción EcoB y EcoK de *E. coli*) y T3 posee en la misma posición otros genes que no existen en T7 (uno de ellos que ocupa la posición del gen 0.3 pero este codifica para la enzima S adenosil metionina hidrolasa cuya función también es inactivar el sistema de restricción del huésped). Es importante notar que estos genes (proteína quinasa y S adenosil metionina hidrolasa) se encuentran en K11 y en el fago IV de *Serratia marcescens* (Korsten et al, 1979), teniendo en cuenta la estructura del árbol presumiblemente también estén presentes en Kvp1 (de hecho la proteína quinasa lo está, ver homología de los fragmentos Alu2 y Alu7). Pero dado que la pérdida de genes en T3 y T7 no se acompaña de una pérdida significativa en la homología general de sus genomas esto indicaría que los eventos de pérdida de bloques no esenciales no involucraron

una divergencia substancial ("runaway") de la secuencia general del genoma. Un proceso de este tipo parece haberse dado en el caso del fago SP6 de *Salmonella* ya que muestra un alto porcentaje de divergencia en el análisis filogenético a partir de la secuencia del gen de la ARN polimerasa.

Finalmente, existe una correspondencia entre el contenido de G+C del genoma de los fagos T7, T3, K11 y SP6 y el contenido de G+C estimado para el genoma de sus respectivos huéspedes (Dietz et al, 1990), esto mismo fue observado en Kvp1 considerando el promedio contenido de G+C de los fragmentos clonados, 52,8 %, como una estimación del contenido de G+C del ADN de Kvp1 y el contenido de G+C del género *Kluyvera* el cual fue estimado entre un 55 y 57 % (Farmer et al, 1981). Cabe aquí preguntarse si la topología del árbol filogenético de los fagos aquí analizados guarda relación con el árbol que relaciona las bacterias huéspedes de dichos fagos, indicando una evolución concomitante. Para responder a esta cuestión, actualmente estamos construyendo el árbol filogenético que relaciona *E. coli*, *Klebsiella*, *Kluyvera* y *Salmonella* en base a la secuencia de sus ARN ribosomales, para ello se está secuenciando el ARN ribosomal de *Klebsiella* cuya secuencia no se encuentra disponible en banco de datos (Pavan et al, en preparación).

BIBLIOGRAFIA

Ackermann, H. W. & Einsenstark, A. (1974). The present stage of phage taxonomy. *Intervirology*. **3**: 201-219.

Ackermann, H. W., Audurier, A., Berthiaume, L. Jones, L. A., Mayo, J. A. & Vidaver, A. K. (1978). Guidelines for bacteriophages characterization. *Advances in Virus Research*. **23**: 1-23.

Adams, M. H. & Wade, E. (1954). Classification of bacterial viruses. The relationship of two *Serratia* phages to coli-dysentery phages T3, T7 and D44. *J. Bacteriology*. **68**: 320-324.

Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*, pp. 450-451. New York: Interscience.

AGOSBA-OSN-SIHN, (1994). *Calidad de las aguas. Franja Costera Sur.* Informe de la Administración General de Obras Sanitarias de la Provincia de Buenos Aires, Obras Sanitarias de la Nación el Servicio de Hidrografía Naval de la Armada Argentina.

Allan, B. J., Davies, P., Carstens, E. B. & Kropinski, A. M. (1989). Characterization of the genome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage ϕ PLS27 with particular reference to the ends of the DNA. *J. Virol.* **63**: 1587-1594.

Asai, T., Aida, K., Sugisaki, Z. & Yakeishi, N. (1955). On a α -ketoglutaric acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1**: 308-346.

Asai, T., Okumura, S. & Tsunoda, T. (1956). On a new genus, *Kluyvera*. *Proc. Jpu. Acad.* **32**: 488-493.

Asai, T., Iizuka, H. & Komagata, K. (1962). The flagelation of genus *Kluyvera*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **8**: 187-191.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-496.

Beier, H. & Hausmann, R. (1973). Genetic map of bacteriophage T3. *J. Virol.* **12**: 413-417.

Beier, H. & Hausmann, R. (1974). T3 X T7 phages crosses leading to recombinant RNA polymerases. *Nature*. **251**: 536-538.

Birboin, C. & Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid. *Nucleic. Acid. Res.* **7**: 1513-1523.

Bonner, W. M. & Laskey, R. A. (1974). A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Europ. J. Biochem.* **46**: 83-88.

Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Rew.* **31**: 230-314.

Braunstein, H., Tomasuolo, M., Scott, S. & Chadwick, N. P. (1980). A biotype of *Enterobacteriaceae* intermediate between *Citrobacter* and *Enterobacter*. *Am. J. Clin. Pathol.* **73**: 114-116.

Brunovskis, I. & Summers, W. C. (1972). The process of infection with coliphage T7. VI. A phage gene controlling shutoff of host RNA synthesis. *Virology* **50**: 322-327.

Condreay, J. P., Wright, S. E. & Molineux I. J. (1989). Nucleotide sequence and complementation studies of the gene 10 region of bacteriophage T3. *J. Mol. Biol.* **207**: 555-561.

David, R. & Hyman, R. (1971). A study in evolution: the DNA base sequence homology between coliphages T7 and T3. *J. Mol. Biol.* **62**: 287-301.

Dietz, A., Kossel, H. & Hausmann, R. (1985). On the evolution of the terminal redundancies of *Klebsiella* phage N° 11 and of coliphages T3 and T7. *J. Gen. Virol.* **66**: 181-183.

Dietz, A., Weisser, H. J., Kössel, H. & Hausmann, R. (1990). The gene for *Klebsiella* bacteriophage K11 RNA polymerase: Sequence and comparison with the homologous genes of phages T7, T3, and SP6. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 283-286.

Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1983). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the location of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* **166**: 477-535.

Edwards, P. R. & Ewing, W. H. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co.

Fainstein, V., Hopper, L. R., Mills, K. & Bodey, G. P. (1982). Colonization by or diarrhea due to *Kluyvera* species. *J. Infect. Dis.* **145**: 127.

Farmer, J. J., III, Fanning, G. R., Huntley-Carter, G. P., Holmes, B., Hickman, F. W., Richard, C. & Brenner, D. J. (1981). *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*: Identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera criocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 919-933.

Farmer, J. J., III, Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., Mc Whorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., O'Hara, C. M., Morris, G. K., Smith, P. B. & Brenner, D. J. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 46-76.

Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. & Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Supplementum 2*. New York. Springer-Verlag Wien.

Gadaleta, P. G., Pavan, M. E. & Zorzopulos, J. (1995). Identification of a member of the *Kluyvera* genus as a established bacterial strain in a very polluted river. Enviado para su publicación en *Microbiology*.

Hausmann, R. L., Almeida-Magalhanes, E. P. & Araujo, C. (1961). Isolation and characterization of hybrids between bacteriophages T3 and T7. *An. Microbiol Univ. Brazil.* **10**: 35-37.

Hausmann, R. (1988). The T7 group. In *The bacteriophages*. Vol I, pp 259-289. Edited by R. Calendar. New York: Plenum Press.

Higgins, D. G., Bleasby, A. J. & Fuchs, R. (1991). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* 5: 151-153.

Holt, J. T. (1989). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 511-513. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore.

Hyman, R. W., Brunovskis, I. & Summers, W. C. (1974). A biochemical comparison of the related bacteriophage T7, ϕ I, ϕ II, W31, H and T3. *Virology* 57: 189-206.

Jogev, R. & Kozloswski, S. (1990). Peritonitis due to *Kluyvera ascorbata*. Case report and review. *Rev. Infect. Dis.* 12: 399-402.

Kassavetis, G. A. , Butler, E. T., Roulland, D. & Chamberlin, M. J. (1982). Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase II. Mapping of SP6 DNA and selective in vitro transcription. *J. Biol. Chem.* 257: 5579-5586.

Kluyver, A. J. & Van Niel, C. B. (1936). Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hig. Abt.* 94: 369-403.

Korsten, K. H., Tomkiewicz, C. & Hausmann, R. (1979). The strategy of infection as a criterion for phylogenetic relationships of non-coli phage morphologically similar to phage T7. *J. Gen. Virol.* 43: 57-73.

Kotani, H., Ishizaki, Y., Hiraoka, N. & Obayashi, A. (1987). Nucleotide sequence and expression of the cloned gene of bacteriophage SP6 RNA polymerase. *Nucleic. Acid. Res.* 15: 2653-2664.

Kwiatkowski, B., Beilharz, H. & Stirm, S. (1975). Disruption of Vi bacteriophage III and localization of its deacetylase activity. *J. Gen. Virol.* 29: 267-270.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage . *Nature* 227: 680-685.

Linderberg, A. A. (1973). Bacteriophage receptors. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 205-241.

Mac Faddin, Jean F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana.

MacGraw, N. J., Bailey, J. N. Cleaves, G. R., Dembinski. D. R., Gocke, C. R., Joliffe, L. K., MacWright, R. S. & MacAllister, W. T. (1985). Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase. *Nucleic. Acids Res.* **18:** 6753-6766.

Moffatt,. B. A., Dunn, J. J. & Studier, F. W. (1984). Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **173:** 265-268.

Pavan, M. E., Gadaleta, P. G. & Zorzopulos, J. (1995). Relationship between the *Kluyvera* genus and other members of the *Enterobacteriaceae* family based on comparative 16S rRNA analysis. Enviado para su publicación en *International Journal of Systematic Bacteriology*.

Pavan, M. E., Vitale, A. & Zorzopulos, J. (1995). Melanin production by *Aeromonas* spp: Strain and pigment characterization. In *Melanin: Its role in human photoprotection*. American Society for Photobiology.

Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **85:** 2444-2448.

Rothman-Dener, T. B., Muthukrishnam, S. Haselborn, R. & Studier, F. W. (1975). A T7 gene function required for shutoff of host and early transcription. In *Virus Research*, pp. 227-239. Edited by C. F. Fox & W. S. Robinson. New York: Academic Press.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstucting phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4:** 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74:** 5463-5467.

Schmitt, M. P., Beck, P. J., Kearney, C. A., Spence, J. L., Digiovanni, D., Condreay, J. P. & Molineux, I. J. (1987). Sequence of conditionally essential region of bacteriophage T3, including the primary origin of DNA replication. *J. Mol. Biol.* 193: 479-495.

Sedmak, J. J. & Grossberg, S. E. (1977). A rapid and versatile assay of proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry* 79: 544-552.

Sherman, L.A., & Haselkorn, R. (1970). LPP-1 infection of the blue-green alga *Plectonema boryanum* III. Protein Synthesis. *J. Virol.* 6: 841-847.

Sinsheimer R. (1959). Purification and properties of bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.* 1:37-42.

Snustad, D. P., Snyder, L. & Kutter, E. (1983). Effects on host genome structure and expression. In *Bacteriophage T4*, pp 40-55. Edited by C. K. Mathews, E. M. Kutter, G. Morig & P. B. Berget. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Studier, F. W. & Maizel, Jr., J. V. (1969). T7 directed protein synthesis. *Virology.* 39: 575-585.

Studier F. W. (1973). Analysis of non-essential bacteriophage T7 genes. *J. Mol. Biol.* 79: 227-230.

Studier F. W. (1979). Relation ship among different strains of T7 and among T7 related bacteriophages. *Virology.* 95: 70-76.

Tristam, D. A. & Forbes, B. S. (1988). *Kluyvera* a case report of urinary tract infection and sepsis. *Pediatr. Infect. Dis.* 7: 297-298.

Towle, H. C., Jolly, L. F. & Boezi, J. A. (1975). Purification and characterization of bacteriophage gh-1 induced deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase from *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 250: 1723-1727.

Vay, C., Mattera, J., Famiglietti, A. M. & Fernandez, A. J. (1993). *Kluyvera ascorbata*: Hallazgo en dos especímenes clínicos. *Infect. Microbiol. Clin.* 5: 36-40.

Vinograd, J. (1963). Sedimentation equilibrium in a buoyant density gradient. In *Methods in enzymology*, Vol 6, pp. 854-870. Edited by Colowick, P. & Kaplan, N. O. New York. Academic Press.


Wassermann, M. & Seligmann, E. (1953). *Serratia marcescens* bacteriophages. *J. Bacteriol.* 66:191-202.


West, D. Lagenaur, C. & Agabian, N. (1976). Isolation and characterization of *Caulobacter crescentus* bacteriophage ϕ Cd1. *J. Virol.* 17: 568-575 .

Wong, V. K. (1987). Broviac catheter infection with *Kluyvera criocrescens*: A case report. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1115-1116.

Yamada, M., Fujisawa, H., Kato, H., Hamada, K. & Minagawa, T. (1986). Cloning and sequencing of the genetic right end of bacteriophage T3 DNA. *Virology.* 151: 350-361.

Yamamoto, K. H. & Alberts, B. M. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40: 734-744.


LIC. PATRICIA GABALETTI


DR. JORGE ZEREPALES