



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

U. N. A. M.

80227/85

A73

Biología

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO  
 TRANSDUCTOR DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA: CONSTRUCCIÓN  
 DE UN FAGO TRANSDUCTOR CON UN MARCADOR DE RESISTEN  
 CIA A AMPICILINA Y REPRESOR TERMOSENSIBLE.

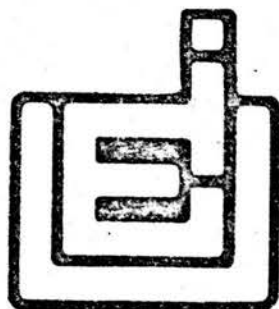
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

DIEGO JULIO ARENAS ARANDA



LOS REYES, IZTACALA

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MI ESPOSA

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MI ABUELITA

## AGRADECIMIENTOS

- A mis padres y a mi abuelita por su dedicación, cariño y ejemplo, así como a mis hermanos Xana, Julio y Germán por todo lo que hemos vivido.
- A Celina por su amor, apoyo y comprensión.
- A mi amigo M.en C. Sergio Vaca por su dirección en la realización de esta tesis, así como por sus enseñanzas, apoyo y amistad.
- A mis amigos Lupita, Bertha, Martha, Rebeca, Roberto, Jaime, Ramón, Enrique, Héctor, Germán y Marcos.
- A la Dra. Elsa Calleja por el apoyo y confianza que me brindó.
- A mis maestros y compañeros de la carrera.

# I N D I C E

=====

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b> .....	1
-	Generalidades del género <i>Pseudomonas</i> .....	1
-	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> en la naturaleza .....	1
-	<u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> como patógena .....	2
-	Genética de <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> .....	8
-	Transposición .....	13
<b>II.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	17
-	Cepas .....	17
-	Soluciones y Medios de Cultivo .....	18
-	Métodos de aislamiento y purificación de fagos de cepas clínicas .....	19
-	Obtención de fagos de alto título .....	19
-	Transducción a prototrofia .....	20
-	Mutagénesis con ácido nitroso .....	20
-	Complementación para represión entre mutantes de fagos deficientes en represión .....	21
-	Obtención de un mutante de rango de huésped .....	21
-	Obtención de un mutante deficiente en la repre sión de las funciones líticas .....	21
-	Inducción de la lisógena PAT2002 (F116L <u>cts</u> ) .....	22
-	Conjugación .....	22
-	Transposición del Tn1 al genoma del fago F116L <u>cts</u> .....	24
-	Estabilidad del Tn1 en el genoma del fago F116L <u>cts</u> .....	24
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	25
-	Aislamiento de bacteriófagos de cepas clínicas....	25
-	Detección de un bacteriófago transductor .....	25
-	Obtención de mutantes claras del fago transduc tor 10 por mutagénesis con ácido nitroso .....	25
-	Prueba de complementación .....	28
-	Obtención de un mutante de rango de huésped .....	28

- Obtención de un mutante claro temperatura sensible ( <u>cts</u> ) del bacteriófago F116L .....	28
- Inducción del bacteriófago F116L <u>cts</u> .....	28
- Conjugación entre las cepas J53RP4 y PAT2002 .....	32
- Transposición del Tn1 al genoma del bacteriófago F116L <u>cts</u> .....	32
- Estabilidad del Tn1 en el genoma del bacteriófago F116L <u>cts</u> .....	35
<b>IV. DISCUSION</b> .....	37
<b>V. BIBLIOGRAFIA</b> .....	41

## I. INTRODUCCION

### 1. Generalidades del Género Pseudomonas

La Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa patógena oportunista que pertenece al género Pseudomonas que fué propuesto en 1966 por Stanier (1), Palleroni (1), y Doudroff (1) en base a las siguientes características: microorganismos aerobios estrictos, unicelulares, con un tamaño de 0.5-1 micras x 1.5-4 micras, móviles debido a la presencia de uno o más flagelos polares, su energía - la obtienen por respiración, no productoras de endosporas, con un porcentaje de G-C en su ADN de 58-69 moles por ciento.

### 2. Pseudomonas aeruginosa en la naturaleza

La P. aeruginosa se encuentra con bastante abundancia en sistemas acuáticos (Dulceacuícolas y marinos), así como - en la superficie de las plantas.

Observaciones a través de microscopios ópticos y electrónicos han revelado que este microorganismo crece en forma de microcolonias cubiertas por moco de naturaleza polisacárida, el cual está cofidicado en su genoma y hace posible que la bacteria se adhiera a las superficies del suelo, plantas, epitelios superficiales de órganos animales, o bien se mantenga en la superficie de aguas dulces o marinas. Se ha sugerido que este moco protege a la bacteria contra el ataque de bacteriófagos y amibas que abundan en los medios que habita (2).

Se han encontrado P. aeruginosa en el suelo, siempre y cuando éste tenga altos niveles de humedad (90%), sin em-

bargo no está claro si este organismo se mantiene ahí por si mismo, ó bien es reintroducida por agua o plantas contaminadas. La presencia de P. aeruginosa en aguas dulces y marinas, se ha asociado a la introducción de materia fecal humana o animal, aunque se ha encontrado este microorganismo en aguas de zonas cálidas no contaminadas con heces pero ricas en materia orgánica (3).

Favero et al (4) demostraron que P. aeruginosa crece en agua destilada. A partir de un inóculo de 100 bacterias en agua destilada (pH = 7.2) se obtuvieron 10 millones de bacterias después de 48 horas, manteniendose la población entre 1 y 10 millones por 42 días. El autor sugiere que el microorganismo usa un nutriente gaseoso que se disuelve en el agua, sin embargo, la bacteria muere en agua ultradestilada después de varios días (3).

### 3. Pseudomonas aeruginosa como patógena

Actualmente P. aeruginosa se ha convertido en un agente importante en las infecciones de pacientes hospitalizados que tienen su sistema inmunológico debilitado, entre las causas que han contribuido al aumento de infecciones por ésta, tenemos; su habilidad de adaptarse a diferentes medios ambientes debido a que pueden utilizar como fuentes de carbono a una gran variedad de compuestos orgánicos, su capacidad de resistir altas concentraciones de muchos antibióticos.

Se han diseñado una serie de metodologías para aislar o identificar a P. aeruginosa. El medio selectivo para aislar el organismo es el agar cetrimida (5). Como método de identificación rápida se suele usar la fluorescencia



a la luz U.V. de las quemaduras infectadas debido a la producción del pigmento fluoresceína (5). Para la identificación se utilizan algunas pruebas bioquímicas características de la especie (5). La distinción de las diferentes cepas se consigue combinando dos de los tres procedimientos de tipificación: Piocinotipia y Fagotipia o Piocinotipia y Serotipia (5).

En los últimos años, los estudios básicos en P. aeruginosa han revelado que las enzimas extracelulares están relacionadas con la virulencia de esta bacteria. Entre las sustancias que tienen un papel importante en la virulencia de P. aeruginosa tenemos: la proteasa, la elastasa, la exotoxina, la leucosidina, el moco, la fosfolipasa C, cuyos efectos se describen en la Tabla No. 1. Además de excretar estas sustancias, este microorganismo produce la endotoxina común a todas las bacterias gram negativas.

La frecuencia de infecciones por P. aeruginosa en hospitales es de aproximadamente 10-20% (6), presentándose principalmente en pacientes con quemaduras (7), leucemia (5), fibrosis quística (8) y pacientes que son tratados con drogas inmunosupresoras (9).

Dentro de las rutas de transmisión reportadas, tenemos alimentos consumidos en los hospitales [del 8-15% de las muestras de alimentos de 8 hospitales ingleses, estaban contaminados con P. aeruginosa (3)], los antisépticos tópicos (5), las soluciones oftálmicas (5), manos de personal del hospital (5), soluciones fenólicas diluídas (5), equipo (sondas, aparatos de succión, esponjas, etc.) (5).

Se ha encontrado una alta cantidad de plásmidos que confieren resistencia a una gran variedad de antibióticos de cepas

clínicas de P. aeruginosa (10,11,12) que dificulta el tratamiento de las infecciones provocadas por esta bacteria.

Básicamente, se han detectado 3 formas de acción de los antibióticos sobre las bacterias:

- a) Interacción del antibiótico con la enzima o proteína blanco, alterando una vía metabólica bacteriana.
- b) Interacción del antibiótico con los ácidos nucleicos evitando la replicación de éstos.
- c) Interacción con los componentes de la membrana afectando el correcto funcionamiento de ésta o su integridad.

Las bacterias se protegen contra los antibióticos básicamente por 4 mecanismos:

- a) Modificación del blanco, el cual se hace insensible al inhibidor.
- b) Provisión de un sistema alternativo que reemplace o suplemente a la molécula inhibida.
- c) Exclusión del inhibidor de su blanco.
- d) Destrucción del antibiótico por hidrólisis, o inactivación de éste. Posiblemente estos sean los mecanismos más usados por las bacterias para protegerse de los antibióticos. Ambos mecanismos de resistencia están bien descritos en P. aeruginosa, en donde se han encontrado por un lado, un buen número de enzimas beta lactamasas y por otro, enzimas que modifican el antibiótico por -

acetilación, fosforilación o adenilación; generalmente, ambos tipos de enzimas son producidas por plásmidos (13).

Aparte de la alta incidencia de plásmidos, la frecuencia de lisógenas entre las cepas clínicas de P. aeruginosa es cercana al 100% (11), que contrasta con otras bacterias como Escherichia coli donde la frecuencia es de aproximadamente el 10% (11). La polilisogenia (más de un profago por bacteria), parece ser común en P. aeruginosa (11), al extremo de haberse detectado una cepa que aloja aproximadamente 8-10 profagos diferentes (11). Las otras especies del género Pseudomonas no muestran la alta frecuencia de lisogenia reportada para P. aeruginosa (11). Se desconoce que factores determinan la alta frecuencia de lisogenia en esta bacteria, sin embargo, se ha detectado que algunas cepas lisógenas, aparte de la habilidad que tienen para producir fagos y la inmunidad a la superinfección por fagos homólogos, presentan una serie de modificaciones conocidas como conversión lisogénica (11) en la cual la bacteria lisógena adquiere una nueva serie de características fenotípicas que son codificadas por el genoma del fago. Como ejemplo de este tipo de cambios, tenemos a los producidos en la bacteria Corynebacterium diphtheria, cuando es lisógenizada por el fago beta, el cual le confiere la capacidad de producir la toxina diftérica, cuyo gene se localiza en el cromosoma viral (14).

En caso de P. aeruginosa la cepa lisógena para el fago D3, sufre un cambio en el antígeno de superficie que evita que fagos del mismo tipo puedan infectarla (11). Liu (11) ha mostrado que cepas lisógenas sufren una serie de alteraciones inducidas por profago, tales como cambios en los componentes de superficie, en la síntesis que aeru

ginosinas y proteasas. Se han detectado fagos que posiblemente estén relacionados con la síntesis de moco (polisacárido) en esta bacteria (11). Existen buenas evidencias para pensar que al menos un fago de esta bacteria tiene en su genoma la información para sintetizar de novo el moco y no que active o desreprima el gene bacteriano que codifica para esta sustancia (11).

A partir del esputo de pacientes con infecciones bronquiopulmonares provocadas por P. aeruginosa se han aislado bacteriófagos (15).

Posiblemente éstos jueguen un papel importante en la virulencia de esta bacteria, lo cual podrá ser aclarado en nuevas investigaciones.

La transducción generalizada (ver más adelante) parece ser común en P. aeruginosa reportándose un buen número de fagos transductores, de los cuales 5 se han estudiado en forma más extensa (11). Como transductores generalizados son capaces de transferencia in vitro los determinantes de resistencia a antibióticos de una cepa a otra; posiblemente esta transferencia se pueda realizar también in vivo, por lo que los fagos contribuirían a diseminar la resistencia a antibióticos en cepas clínicas, lo cual contribuiría a que este microorganismo emergiera por selección en los hospitales, donde se usan antibióticos.

**T A B L A 1**

=====

SUSTANCIAS EXTRACELULARES DE P. aeruginosa  
RELACIONADAS CON SU VIRULENCIA

<u>SUSTANCIA</u>	<u>EFECTO</u>
Exotoxina A	ADP-Ribosilación de EF-2 letal para ratón.
Proteasa y Elastasa	Hemorragias de órganos internos, Destrucción de tejido corneal (E) destrucción 7/9 complemento. Inhibe movimiento de Polimorfonucleares y fagocitosis (E) inactivación de inhibidor Alfa-1.
Moco	Inhibición de Fagocitosis (Leuco.) Efecto similar a infección en ratón
Leucocidina	Destrucción de Leucocitos
Fosfolipasa C	Hidrólisis de Fosfolípidos (Hemólisis). Probable efecto citopático en pulmón.

Tomado de: Homa, J. Yuzuru, (1978), Progress in the study on P. aeruginosa with emphasis on its Pathogenicity. Asian Med. J. 21:8.

#### 4. Genética de Pseudomonas aeruginosa

El estudio genético de P. aeruginosa, ha sido abordado con una serie de técnicas genéticas utilizadas en otras bacterias:

- a) La conjugación, que es el paso del ADN de una bacteria donadora (portadora de un plásmido conjugativo) a una receptora a través de un puente citoplásmico (16), ha sido de gran utilidad para conocer el genoma de esta bacteria, sin embargo en el caso de la cepa PAO (una de las cepas de P. aeruginosa genética y bioquímicamente más estudiado) no se ha podido demostrar la circularidad de su genoma debido a que existen una serie de problemas para mapear marcadores más allá del minuto 40, lo cual se debe a que los plásmidos disponibles para este tipo de estudios (FP2, FP110, R68, R91-5) presentan, en general, un solo sitio de inserción en el cromosoma bacteriano, por lo cual difícilmente se consigue la transferencia de marcadores alejados de este sitio de inserción (17).
- b) La transformación que consiste en el paso de ADN desnudo de una bacteria a otra llamada competente (16), no ha sido útil para mapear el cromosoma de P. aeruginosa, debido a que a pesar de que se ha podido transformar con ADN de plásmidos no se ha podido hacer con marcadores cromosómicos (17).
- c) La transducción que consiste en el paso del ADN de una bacteria a otra mediado por un bacteriófago (16), ha sido de gran utilidad para establecer el orden de marcadores cercanos o ligados en el cromosoma de P. aeruginosa.



Se han detectado dos tipos de bacteriófagos en referencia a su ciclo de vida; el lítico y el lisogénico (Fig. 1)

En el ciclo de vida lítico, existen 3 pasos secuenciales:

- a) Adsorción. El fago se fija a la bacteria reconociendo receptores específicos en la superficie bacteriana e inyecta su ADN, este paso dura aproximadamente un minuto.
  
- b) Período de latencia o fase vegetativa. Poco después de la inyección, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del huésped cesa, se inicia la expresión de los genes tempranos del fago que codifican para proteínas involucradas principalmente, en la síntesis de los ácidos nucleicos virales, dichas proteínas se detectan un minuto después de la infección y se acumulan hasta 10-15 minutos después de ésta. A los 6 minutos se inicia la síntesis de los ácidos nucleicos del fago que es concurrente con la transcripción de los genes tardíos de éste, involucrados principalmente en la producción de proteínas estructurales del fago. A los 10 minutos el ADN fágico empieza a ser empaquetado en las cápsides que están fijadas a la membrana citoplásmica, las vainas y fibras de la cola se forman por procesos separados y se unen a las cabezas generándose partículas infecciosas aproximadamente a los 12 minutos y terminando la fase de eclipse. Continúan formándose partículas infecciosas hasta aproximadamente los 24 minutos.
  
- c) Lisis. Aproximadamente a los 24 minutos se lisa la célula por la acción de enzimas líticas codificadas por genes virales tardíos, liberándose aproximadamente 100 nuevas partículas infecciosas (18).

En el ciclo de vida de un fago lisogénico o temperado, éste infecta a la bacteria de una manera similar al fago lítico, sin embargo una vez inyectado el ADN, éste puede permanecer circularizado en el citoplasma bacteriano a manera de plásmido, como el fago P1 de E. coli, o bien se integra el cromosoma bacteriano como el fago lambda también de E. coli, en ambos casos se reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis por acción de un represor codificado por el genoma viral. Un estímulo externo, por ejemplo, la irradiación con la luz UV de un cultivo de lisógenas puede provocar que el profago entre el ciclo lítico debido a la inactivación del represor y termine lisando a la bacteria produciéndose nuevas partículas infecciosas (19).

Algunos fagos temperados son capaces de transducir ADN bacteriano. Se han detectado dos tipos de transducción; la generalizada, en la cuál el fago tiene la capacidad de transducir con la misma probabilidad cualquier marcador del cromosoma bacteriano; y la especializada, en donde el fago transduce solamente marcadores adyacentes al sitio de integración en el cromosoma bacteriano. Se han encontrado un buen número de fagos transductores generalizados en diferentes especies bacterianas, por ejemplo, el P1 de E. coli, P22 de Salmonella typhimurium el F116L y G101 en P. aeruginosa, etc. Estos empaquetan fragmentos del cromosoma bacteriano en las nuevas cápsides, al fin de su fase vegetativa (16).

Los fagos transductores generalizados, carecen de su genoma y en su lugar, llevan un fragmento del cromosoma bacteriano, estos fagos no dotan a la célula lisógena de la inmunidad contra fagos homólogos, ni presentan multiplicación vegetativa (19).



El porque no todos los fagos temperados son transductores generalizados, posiblemente se debe a que éstos últimos - son menos selectivos que los primeros para escoger el ADN a encapsidar, o bien el corte de fragmentos adecuados del cromosoma bacteriano se da en el momento del empaquetamiento del ADN viral en las cápsides. La frecuencia de transducción generalizada esta comprendida entre  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$

La forma de mapear marcadores cercanos con esta técnica - es mediante el cálculo de las frecuencias de cotransducción (cuando un fago transduce dos marcadores a la vez) por lo tanto, mientras más cercanos estén dos marcadores mayor será la frecuencia de cotransducción, conociéndose ésta y la longitud media del ADN transductor, es posible saber la distancia relativa entre dos marcadores, mediante la siguiente ecuación:

$$d = \sqrt[3]{1 - X} \cdot L$$

En donde:

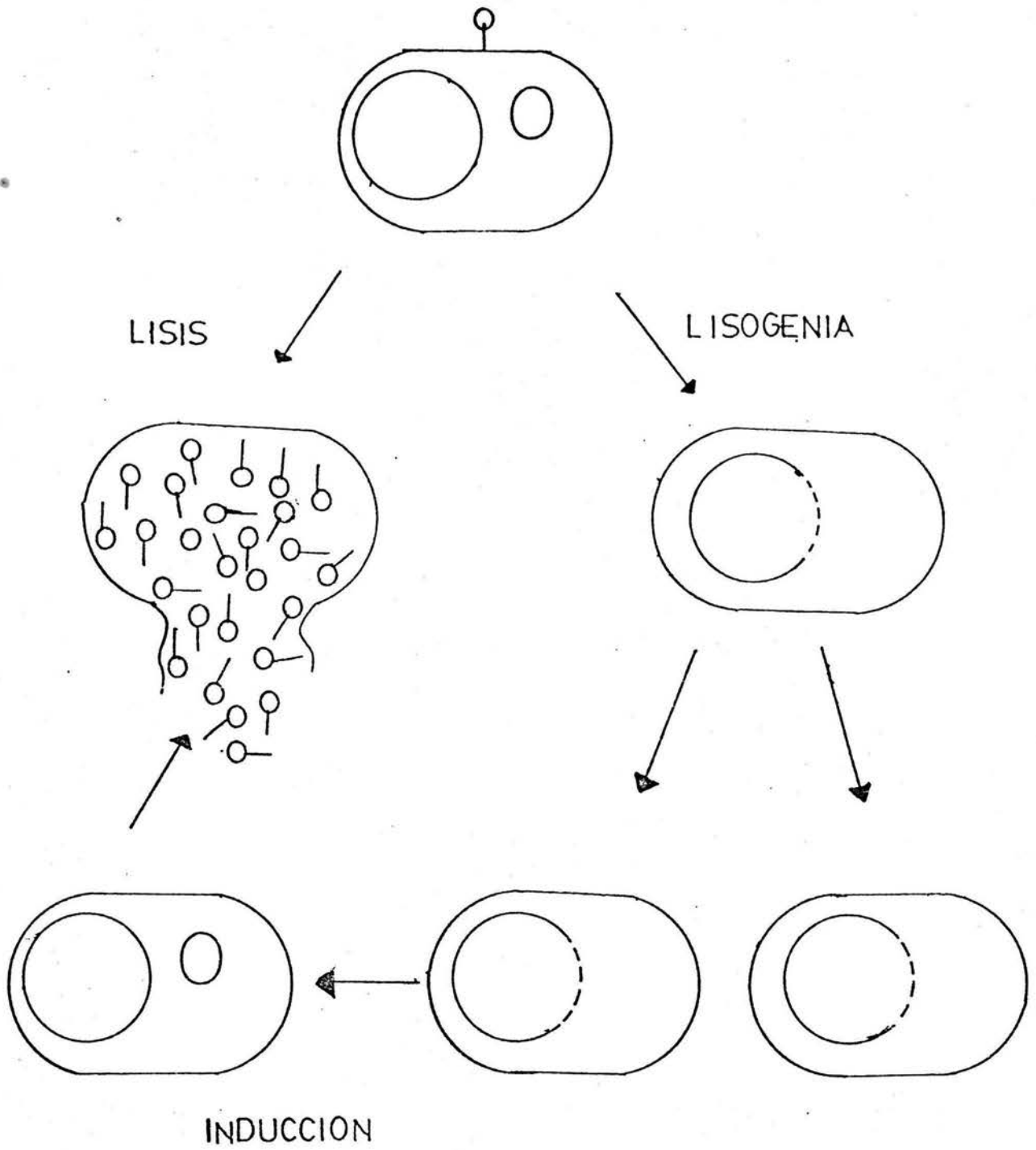
d = distancia entre dos marcadores

L = Longitud media del ADN transductor

X = Frecuencia de cotransducción

Con esta técnica y la conjugación se han hecho mapas muy precisos de diferentes genomas bacterianos (16).

Para mapear el genoma de P. aeruginosa por transducción se han usado los fagos transductores generalizados F116L (20) y G101 (21) cuyos ADNs tienen 41 y 38 megadaltons de peso molecular, respectivamente y que transducen marcadores a una frecuencia de  $1 \times 10^{-7}$  -  $5 \times 10^{-7}$ /u.f.p. (unidades formadoras de placa) (11). No se han encontrado - fagos transductores especializados en esta bacteria (17).



## 5. Transposición

Todo lo referido a la transposición fué tomado de Lewin (22).

Se han descubierto secuencias tanto en procariotes como eucariotes que tienen la capacidad de moverse de un sitio del genoma a otro, el nombre que reciben es el de elementos transponibles o transposones (Tn). La transposición bacteriana involucra duplicación del elemento, una copia permanece en el sitio donador original mientras que la otra copia en el sitio blanco. La naturaleza básica de la transposición (Fig. 2) es igual para todos los transposones y generalmente involucra dos pasos.

- a) Replicación del transposon sin la replicación de las secuencias cromosómicas adyacentes.
- b) Cortes en la secuencia blanco que genera el sitio de inserción del transposon.

Un factor en la transposición es que no necesariamente debe existir homología entre las secuencias de los sitios donador y blanco.

La transposición puede provocar deleciones, inversiones, translocaciones, ya que forma sitios de recombinación recíproca entre diferentes secuencias de ADN, un ejemplo concreto es la integración del plásmido F de E. coli en su cromosoma, por un proceso de recombinación mediada por un transposon en el ADN del plásmido y un transposon homólogo en el ADN bacteriano.

La mayoría de los transposones tienen múltiples sitios de inserción, aunque hay algunos que tienen preferencia por ciertas secuencias. La frecuencia de transposición está comprendida entre  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$ , la reversión es infrecuente (frecuencia de  $10^{-6}$  -  $10^{-10}$ ).

En general los transposones tienen cierto número de patrones en común como:

- a) Cada elemento es una unidad autónoma que codifica las proteínas necesarias para la transposición, algunos solo tienen los genes necesarios para ésta, otros llevan genes adicionales.
- b) Generalmente provocan efectos polares, es decir, disminuyen la expresión de genes distales al sitio de inserción.
- c) Cada elemento posee repeticiones terminales invertidas cortas muy parecidas y en ocasiones idénticas.
- d) El sitio de integración del transposon presenta repeticiones directas muy cortas en ambos lados, las cuales varían de transposon a transposon, pero generalmente son constantes en la longitud.

Los transposones más sencillos son las secuencias IS (secuencias de inserción) que se han encontrado en plásmidos y cromosomas bacterianos y eucarióticos, los genes que la forman solo tiene la función de la transposición. Algunos transposones acarrean genes que confieren resistencia a metales pesados y antibióticos aparte de los genes involucrados en la transposición. Los brazos de éstos están formados por secuencias parecidas o iguales a las IS llamadas módulos IS, que pueden ser idénticas o cercanamente rela-

cionadas dependiendo del transposon.

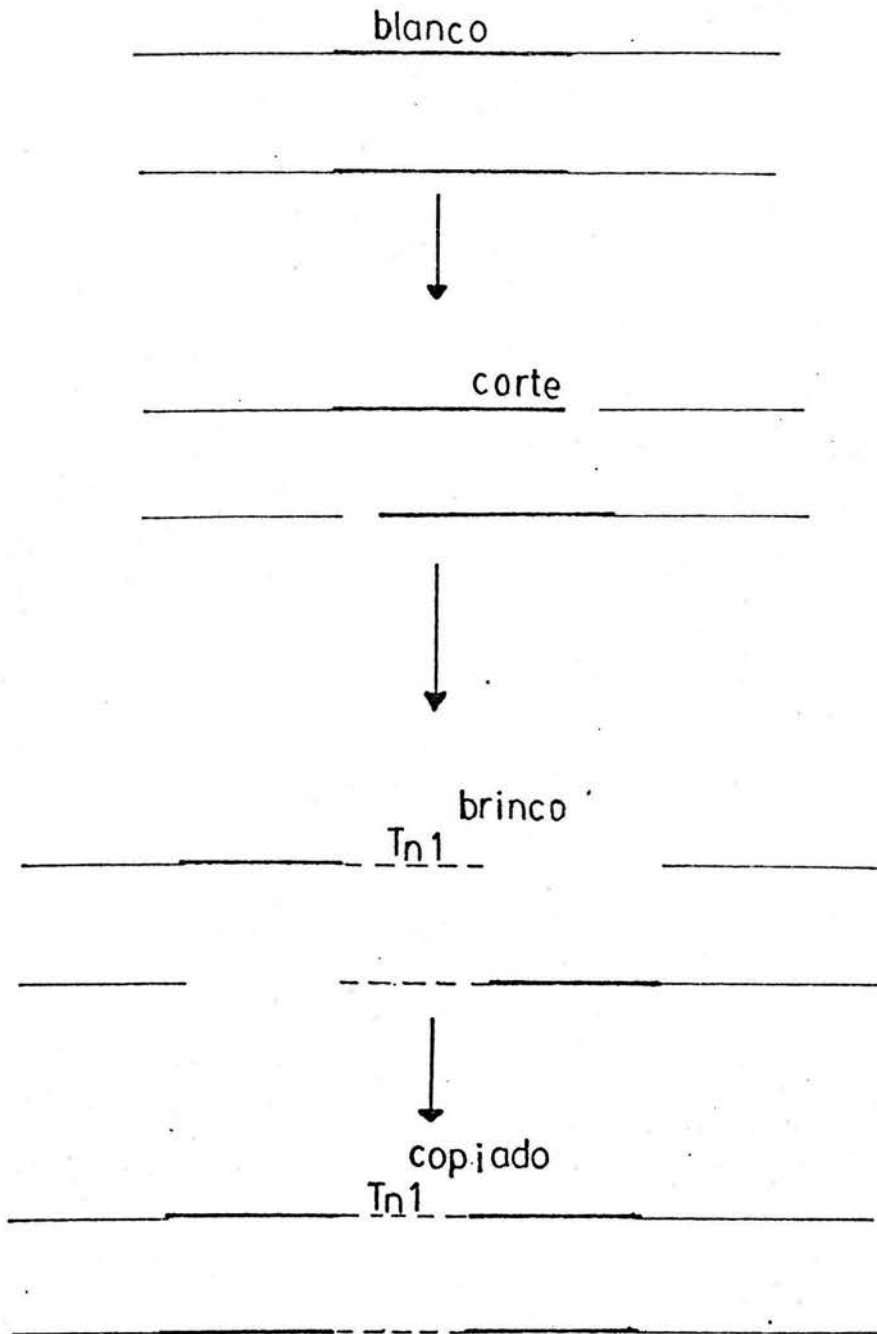
El transposon Tn1 consta de aproximadamente 5,000 pares de bases de longitud, aparte de poseer genes involucrados en la transposición, tiene otros que confieren resistencia a la ampicilina en el genoma portador. Tiene múltiples sitios de inserción en el genoma bacteriano, inicialmente se detectó en el plásmido RP4. Este plásmido se detectó originalmente en P. aeruginosa, aparte de conferir resistencia a la ampicilina por el Tn1, confiere resistencia a Kanamicina y Tetraciclina, su peso molecular es de  $36 \times 10^6$  d., el porcentaje de G-C en el ADN es de 58-60% y en caso de E.coli hay de 1 a 3 copias por cromosoma (23).

El objetivo de nuestro trabajo fué obtener una mutación temperatura sensible en el represor y un marcador de resistencia a un antibiótico en el fago F116L de P. aeruginosa. El uso de estos fagos transductores es de gran utilidad en los trabajos de mapeo ya que permite seleccionar las colonias - lisógenas por la presencia del marcador de resistencia, así como la obtención de fagos por la inducción térmica de éstas. Este tipo de fagos también se puede usar como vehículo para realizar la transposición, lo cual nos permitiría aislar mutantes, construir cepas, realizar mutagénesis localizada, aislar deleciones, etc. (24)

FIGURA 2

=====

Transposición



1. Cepas

Las cepas bacterianas y los fagos empleados durante este trabajo se describen en las tablas 2 y 3.

TABLA 2

<u>NOMBRE</u>	<u>CARACTERISTICAS RELEVANTES</u>	<u>ORIGEN</u>
PHC	Cepa clínica de <u>P. aeruginosa</u> aislada del Hospital Civil de Morelia, Mich.	M. en C. Carlos Cervantes
PIS	Cepa clínica de <u>P. aeruginosa</u> aislada del Hospital del ISSSTE de Morelia, Mich.	" "
PAT 964	<u>P. aeruginosa</u> , protótrofa	Dr.B.W. Holloway.
PAO 1	<u>P. aeruginosa</u> , protótrofa	" "
PAO1161	<u>P. aeruginosa</u> , rif <sup>r</sup> , leu <sup>-</sup> , res <sup>10</sup>	" "
PAT 2002	<u>P. aeruginosa</u> , met <sup>-</sup> 3109	" "
PU21	<u>P. aeruginosa</u> , (deriv. de PAO), ilv <sup>-</sup> B112, leu <sup>-</sup> , str <sup>r</sup> , rif <sup>r</sup>	" "
PAT2002 rif <sup>r</sup>	<u>P. aeruginosa</u> , met <sup>-</sup> , rif <sup>r</sup>	Este trabajo
PAT2002 (F116L <sub>cts</sub> )	<u>P. aeruginosa</u> , met <sup>-</sup> , lisógena para el bacteriófago F116L <sub>cts</sub>	" "
PAT2002 RP4	<u>P. aeruginosa</u> , met <sup>-</sup> , rif <sup>r</sup> , RP4 (Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> )	" "
PAT2002 RP4 (F116L <sub>cts</sub> )	<u>P. aeruginosa</u> , met <sup>-</sup> , rif <sup>r</sup> , RP4 (Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> ), lisógena para el fago F116L <sub>cts</sub> .	" "
Q1	<u>E. coli</u> , protótrofa, amp <sup>s</sup> , rif <sup>s</sup>	Singer y Weil (25)
J53 RP4	<u>E. coli</u> pro <sup>-</sup> , met <sup>-</sup> , RP4 (Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> )	Dr. Jacobo Kupers- toch.

TABLA 3BACTERIOFAGOS DE P. AERUGINOSA UTILIZADOS

<u>NOMBRE</u>	<u>CARACTERISTICAS RELEVANTES</u>	<u>ORIGEN</u>
10	Fago temperado, transductor	Este trabajo
10c <sub>1</sub>	Mutante deficiente en represión obtenido por mutagénesis del fago 10 con HNO <sub>2</sub>	" "
10c <sub>1</sub> h	Mutante espontáneo de rango de huésped del fago 10c	" "
F116L	Fago temperado, transductor generalizado	Dr.V. Krishnapillai
F116L <sub>cts</sub>	Fago transductor, represor termosensible	Este trabajo
F116L <sub>cts</sub> (Ap <sup>r</sup> )	Fago F116L <sub>cts</sub> , con el transposon Tn1 insertado en su cromosoma	" "

2. Soluciones y medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios y soluciones, CN (caldo nutritivo) (Peptona de gelatina 5.0 g/l, extracto de carne 3.0 g/l); AN (agar nutritivo) (CN 8 g/l, agar bacteriológico 6 g/l, se esterilizó y agregaron 5 ml. de CaCl<sub>2</sub> 1M); M9 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH<sub>4</sub>Cl 1 g/l, se esterilizó y se agregó 1 ml. de MgSO<sub>4</sub>, 10 ml/l de CaCl<sub>2</sub> 0.01M y 10 ml/l de glucosa al 20%); M9 sólido (se preparó un volumen de M9 y por separado un volumen de agar al 3%, se esterilizaron y mezclaron continuándose la preparación como el medio anterior); M9 suave (se preparó en forma idéntica al M9 sólido, pero con 6 g/l de agar); EMB (bacto-peptona 10 g/l, fosfato dipotásico 2 g/l, bacto-agar



15 g/l, bacto-eosina 0.4 g/l, bacto-azul de metileno 0.065 g/l); ANRA (agar nutritivo más rifampicina 50 microgramos/ml más ampicilina 750 microgramos/ml.); SM(NaCl 5.85 g, agua 480.5 ml, ajustando a pH = 7.4, después de esterilizar se agregaron Tris 1M, pH = 7.4 5ml, MgSO<sub>4</sub> 1M 2.5 ml); MC (MgSO<sub>4</sub> 0.1M, CaCl<sub>2</sub> 0.005M); TMB (Tris HCl 10<sup>-1</sup>M, pH = 7.5, MgSO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup>M); solución amortiguadora ácida (MgSO<sub>4</sub> 40mM, acetato de sodio 0.25M, pH = 4.25); citrato de sodio (citrato de sodio 10<sup>-2</sup> M, pH = 8.5).

### 3. Métodos

#### 1) Método de aislamiento y purificación de fagos de cepas clínicas.

Se crecieron las cepas clínicas en CN 12 horas a 37°C. Se centrifugaron a 15,000 rpm, 5 minutos y los sobrenadantes se gotearon sobre un tapiz de una cepa indicadora en AN incubándose a 37°C durante 12 horas. Para confirmar que los halos de lisis observados fueran producidos por fagos, se realizó la purificación que consistió en tomar un inóculo del halo con un palillo estéril y trazar una línea superficial de un extremo a otro de una caja con AN, e inmediatamente vaciar sobre ésta 0.2 ml. de un cultivo de una cepa indicadora con 2.5 ml. de AS incubándose durante 12 horas a 37°C. A partir de las placas aisladas resultantes se repitió el procedimiento de purificación 2 veces más.

#### 2) Obtención de fagos de alto título.

Los lisados de fagos se obtuvieron mezclando 0.5 ml. de una cepa indicadora crecida durante toda la noche en CN a 37°C, más una placa de fago en 10 ml. de CN. Se incubó a 37°C hasta lisis (4-5 horas). Se centrifugó a 15,000 rpm. durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante a un tubo estéril almacenándose a 4°C.

## 3) Transducción a prototrofia.

3.1 Preparación del fago transductor. Se incubó con agitación 0.2 ml. de la cepa PA01 en 10 ml. de CN a 37°C, hasta 40 unidades Klett (aproximadamente  $2 \times 10^8$  cel/ml). Se infectó con un fago transductor a una multiplicidad de infección (mdi.) = 0.01, se incubó con agitación a 37°C durante 12 horas. El cultivo se centrifugó a 15,000 rpm durante 5 minutos, filtrándose el sobrenadante a través de un filtro millipore de 0.2 micras de diámetro de poro.

3.2 Transducción. Se inocularon 0.2 ml. de la cepa PAT2002 en 10 ml. de CN cultivándose a 37°C durante 12 horas, se resuspendieron 5 ml. del cultivo en 2 ml. de MC, incubándose a 37°C durante 15 minutos, se infectó el cultivo con el fago transductor obtenido en el paso 3.1, conforme a la siguiente tabla.

	1	2	3	4	5	6	7
Receptora	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
Bacteriófago (0.1 ml)	$10^0$	$10^{-1}$ dil.	$10^{-2}$ dil.	$10^{-3}$ dil.	$10^{-4}$ dil.	---	$10^0$
Citrato de Sodio	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.

Se permitió la adsorción 20 minutos a 37°C. Se vació con M9 suave (2.5 ml.) a cajas con M9 sólido, incubándose a 37°C durante 24-48 horas.

4) Mutagénesis con ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ).

Se mezclaron en el siguiente orden 1.8 ml. de solución amortiguadora ácida, 0.2 ml. de una suspensión de fago a mutagenizar, y 0.2 ml. de una solución de nitrito de sodio (35 mg/ml. de agua estéril), en un tubo de ensaye estéril, agitando se inmediatamente, se incubó a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 10 microlitros a los 10, 20, 30 y 40 minutos parando la reacción a cada tiempo por dilución en 10 ml.

de SM más Tris  $10^{-1}$ M, pH = 7.4. Se tituló por duplicado incubándose a 37°C durante 12 horas.

- 5) Complementación para represión entre mutantes de fagos deficientes en represión.

Sobre un tapiz de una cepa indicadora apropiada crecida en cajas de petri con medio EMB, se colocó una gota (20 microlitros) de una suspensión de fago ( $10^7$  ufp/ml.) por complementar, permitiendo que ésta se extendiera diametralmente en la caja. Una vez seca esta gota se cruzaron sobre ella gotas de suspensiones ( $10^7$  ufp/ml.) de los otros fagos por complementar. Se dejó secar y se incubó a 37°C por 12 horas. Si las mutaciones que producen placa clara afectan genes distintos, se observará turbidez en la intersección de las gotas, de lo contrario se observarán halos de lisis claros.

- 6) Obtención de un mutante de rango de huésped.

El fago 10c<sub>1</sub> obtenido sobre la cepa PAT 964 y que no puede crecer sobre la cepa PA01, se plaqueó en exceso sobre ésta última con la finalidad de aislar un mutante rango de huésped.

- 7) Obtención de un mutante deficiente en la represión de las funciones líticas.

El fago F116L (placa turbia) fué mutagenizado con ácido nítrico, como ya se ha descrito. Cada una de las placas claras obtenidas a 40°C se purificó al menos dos veces y se inoculó con un palillo estéril por duplicado sobre un tapiz de la cepa PAT2002 en AN. Una caja se incubó a 30°C y la otra a 40°C. En caso de aparecer una mutación temperatura sensible (ts) en el represor, se esperaría obtener placa turbia a 30°C y placa clara a 40°C.

## 8) Inducción de la lisógena PAT2002 (F116Lcts).

8.1 Obtención de lisógenas. Se colocaron gotas de 10 microlitros de una dilución  $10^{-5}$  del fago F116Lcts (título original  $1 \times 10^{10}$  ufp/ml.) sobre un tapiz de la cepa PAT2002 en AN. Se incubó a 30°C durante 12 horas. A partir de las manchas confluentes turbias (halos de lisis) formadas se obtuvieron colonias aisladas mediante el método de estría en cajas de petri con AN. Se confirmó que las colonias aisladas eran lisógenas mediante la liberación de fagos sobre un tapiz de cepa sensible a éstos.

8.2 Inducción de la lisógena; se inocularon 0.2 ml. de cultivos saturados de la cepa PAT2002 (F116Lcts) y PAT2002 (control) en 10 ml. de CN por cepa, incubándose a 30°C hasta 20-25 UK, durante los 30 minutos siguientes, los cultivos se incubaron a 40°C (choque térmico), después se mantuvieron a 37°C esperando una disminución significativa de UK de la cepa lisógena. Al disminuir las UK de ésta, se adicionaron 5 microgotas de cloroformo incubándose 15 minutos a 37°C. El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 15,000 rpm, vaciándose el sobrenadante a un tubo estéril del cual se tomó la muestra para titular el fago.

## 9) Conjugación

### 9.1 Resistencia a antibióticos de las cepas a conjugar.

En una serie de tubos de ensaye estériles con diferentes concentraciones del antibiótico (preparados en CN) se diluyó 1/200 la cepa a probar esperando crecimiento o no - crecimiento, mediante la aparición de turbidez en el medio después de incubar 12 horas a 37°C. Los tubos controles fueron un tubo con cepa más CN sin antibiótico y un tubo con la máxima concentración del antibiótico sin la cepa.

### 9.2 Prueba de la presencia de RP4 en la cepa J53.

Sobre cajas de petri con AN más 750 microgramos/ml. de ampicilina se vació 0.2 ml. de la cepa de E.coli Q1 (amp<sup>S</sup>) con 2.5 ml. de AS por caja, una vez solidificado el AS se inocularon con palillos estériles las cepas J53 (RP4), PU21 (control) y Q1 (control), que provenían de cultivos saturados en CN.

En caso de que esté presente el plásmido RP4 en la cepa J53, crecerán colonias de Q1 a su alrededor (colonias satélites), debido a la producción de la enzima beta lactamasa que puede difundir al medio extracelular inactivando el antibiótico en el área circundante. Si la resistencia a la ampicilina está en el genoma de la cepa J53 no se producirá la beta lactamasa y por lo tanto no habrá colonias satélites de Q1, ya que ésta última cepa es sensible al antibiótico.

### 9.3 Obtención de un mutante espontáneo rif<sup>r</sup> en la cepa PAT2002.

Se espatularon 0.2 ml. de un cultivo saturado de la cepa PAT2002 (rif<sup>S</sup>) en cajas de petri con AN más 500 microgramos/ml. de rifampicina, incubándose de 12-24 horas a 37°C.

### 9.4 Conjugación. Se crecieron en CN las cepas donadoras (J53) y receptora (PAT2002) por separado hasta 25 UK. Se tomaron 0.1 ml. de cada cepa y se mezclaron en 2 ml. de CN, agitándose moderadamente. La mezcla se incubó sin agitación durante 24 horas a 37°C. Se espatularon 0.1 ml. de este cultivo en cajas de petri con ANRA incubándose a 37°C durante 24-48 horas, los controles fueron la cepa donadora y receptora espatulándose por separado en el mismo medio. Las exconjugantes resultantes se inocularon con palillos estériles en cajas de petri con AN más 25 microgramos/ml de tetraciclina, incubándose a 37°C durante 24-48 horas, siendo el control una cepa sensible a la tetraciclina.

## 10. Transposición del Tnl al genoma del fago F116Lcts.

- 10.1 Obtención de lisógenas. La metodología para obtener y confirmar las lisógenas es similar a la descrita en el paso 8.1, diferenciándose de éste en que aquí se usó como tapiz la cepa PAT2002 RP4 en cajas de petri con AN más 750 microgramos/ml de ampicilina.
- 10.2 Inducción de la lisógena. La inducción de la lisógena PAT2002 RP4 (F116Lcts) se hizo de acuerdo al paso 8.2, diferenciándose de éste en que aquí el CN tenía 750 microgramos/ml. de ampicilina, con la finalidad de seleccionar solamente las cepas con el RP4.
- 10.3 Transducción de resistencia. La metodología está descrita en el paso 3 diferenciándose de éste en que el AN para seleccionar las colonias transductantes tenía 750 microgramos/ml. de ampicilina.
- 10.4 Inducción en masa. Se incubaron juntos aproximadamente de 20 a 30 inóculos de colonias transductantes en CN - más ampicilina (750 microgramos/ml) a 30°C en agitación durante 12 horas. Este cultivo fué inducido mediante - la metodología descrita en el paso 10.2, con el fago obtenido se realizó una nueva transducción, como la descrita en el paso 10.3.

## 11. Estabilidad del Tnl en el genoma del fago F116Lcts.

Se goteó (10 microlitros) una solución del fago F116Lcts Ap<sup>r</sup> ( $10^{10}$  ufp/ml) obtenido del paso 10.4, sobre un tapiz de PAT2002 en AN. A partir de los halos de lisis se obtuvieron colonias aisladas por el método de estría en AN. Se confirmó que estas colonias fueran resistentes a la ampicilina y lisógenas para el F116LctsAp<sup>r</sup>, mediante el crecimiento en AN más 750 microgramos/ml. de ampicilina a - 30°C y la liberación de fagos a 40°C



### III. RESULTADOS

#### 1. Aislamiento de bacteriófagos de cepas clínicas

A partir de 40 cepas clínicas de P. aeruginosa se aislaron 35 bacteriófagos, mediante la técnica de goteo sobre un tapiz de cepa sensible. El porcentaje de cepas clínicas lisógenas fué de 87.5%. De estos fagos aislados, detectamos al menos 5 grupos diferentes, mediante la habilidad de multiplicarse en las cepas de P. aeruginosa PAT964, PA01, PA01161  
Tabla 4.

#### 2. Detección de un bacteriófago transductor

Se detectó al menos un bacteriófago transductor del grupo de fagos aislados de las cepas clínicas al cual le asignamos el No. 10. Este pudo transducir el marcador  $met^+$  de la cepa protótrofa PAT964 a la cepa auxótrofa PAT2002  $met^-$ , a una frecuencia de  $5.2 \times 10^{-7}$ /ufp.

#### 3. Obtención de mutantes claras del fago transductor 10 por mutagénesis con ácido nitroso.

Con el propósito de averiguar cuantos genes están involucrados en la represión de las funciones líticas del fago transductor, obtuvimos 24 mutantes deficientes en la represión mediante mutagénesis in vitro con ácido nitroso. La figura No. 3, muestra la curva de letalidad del fago transductor por tratamiento con ácido nitroso. Se observa una muerte lineal, disminuyendo el título del fago en un logaritmo cada 10 minutos. La frecuencia de aparición de mutantes claras fué de 1% a los 10 minutos de tratamiento. En el control sin tratar, la frecuencia de claras fué menor de  $10^{-5}$ .

TABLA 4

Patrón de plaqueo de los bacteriófagos de cepas clínicas

<u>PAO1</u>	<u>PAO1161</u>	<u>PAT964</u>	<u>No. lisados</u>
+	-	-	1
-	+	-	5
-	-	+	3
-	+	+	21
+	+	+	4

Los bacteriófagos se detectaron goteando los sobrenadantes de los cultivos de las cepas clínicas sobre tapices de las cepas PAT964, PAO1 y PAO1161 en AN.

+ = lisis

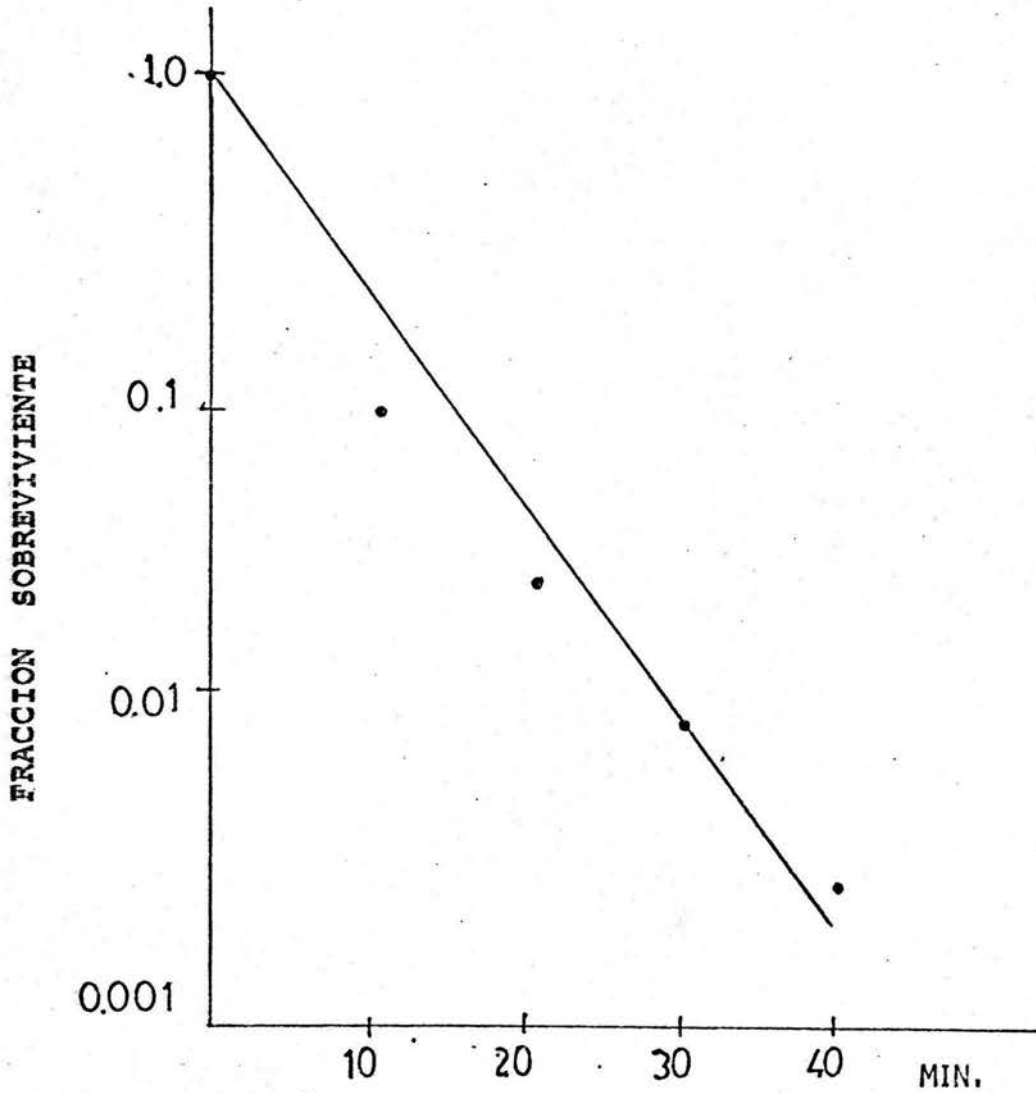
- = no lisis



FIGURA 3

=====

Curva de letalidad del fago transductor 10 por tratamiento con ácido nitroso.



El fago se trató con ácido nitroso como se describe en material y métodos, deteniendo la reacción a los tiempos indicados, midiendo la fracción sobreviviente.

#### 4. Prueba de complementación

A partir de 24 mutantes independientes afectados en la represión de las funciones líticas obtenidas mediante la mutagénesis con ácido nitroso, se realizaron pruebas de complementación. La tabla 5 muestra que existen 2 grupos diferentes de complementación, lo que nos permitió concluir que al menos hay dos genes involucrados en la represión de las funciones líticas.

#### 5. Obtención de un mutante de rango de huésped

Para poder transducir marcadores genéticos a la cepa PA01 de P. aeruginosa, fué necesario obtener un mutante de rango de huésped del fago transductor 10. Como se observa en la tabla 6, el mutante 10c<sub>1</sub>h tiene una eficiencia de plaqueo sobre PA01 de 0.98.

#### 6. Obtención de un mutante claro temperatura sensible (cts) del bacteriófago F116L

Mediante la mutagénesis con ácido nitroso sobre el bacteriófago F116L se obtuvo un mutante cts, el cual forma placa clara de 40°C y placa turbia a 30°C sobre un tapiz de cepa sensible. El fago F116Lcts se obtuvo a una frecuencia de 1/650.

#### 7. Inducción del bacteriófago F116Lcts

Con el fin de confirmar la mutación cts en el genoma del F116L, se realizó la inducción de la lisógena PAT2002 (F116Lcts)

El control fué la cepa no lisógena PAT2002. Como se observa en la gráfica de la Figura 4, aproximadamente, 30 minutos después del choque térmico, la cepa lisógena deja de crecer y empieza a lisarse, lo cual no se observa en la cepa no lisógena. El stock obtenido por inducción de la cepa lisógena se filtró y tituló sobre una cepa sensible obteniéndose un título de  $1 \times 10^{10}$  ufp/ml.

TABLA 5

Complementación para represión entre mutantes del bacteriófago 10 c.

<u>No. de mutantes</u>	<u>Bacteriófago 10<u>c</u><sub>1</sub></u>	<u>Bacteriófago 10<u>c</u><sub>2</sub></u>
1, 3, 6, 10, 15, 17, 33, 34, 36.	-	+
2, 4, 5, 9, 11, 12, 13, 18, 22, 24, 26, 16, 19, 30, 32.	+	-

La complementación se realizó como se describe en Material y Métodos.

+ = Complementación (formación de halos de lisis turbios)

- = No complementación (formación de halos de lisis claros)

TABLA 6

Eficiencia de plaqueo del bacteriófago 10 en cepas de P. aeruginosa

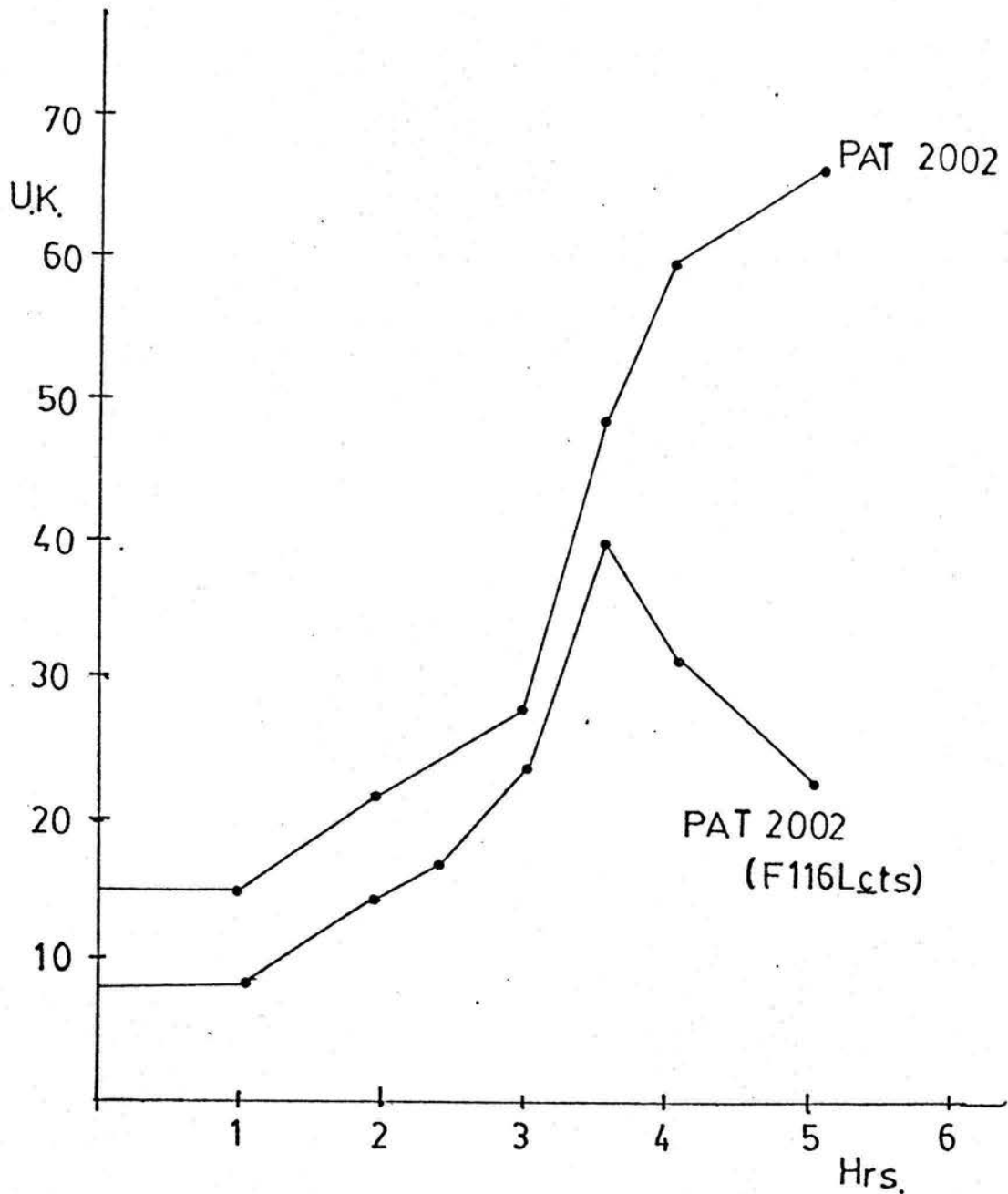
<u>Bacteriófago</u>	<u>PA01</u>	<u>PAT964</u>
10	$4,5 \times 10^{-4}$	1.0
10 <u>c</u>	0.98	1.0

El bacteriófago se tituló en ambas cepas, tomándose como 1 el título obtenido en PAT964.

FIGURA 4

=====

Inducción térmica de la lisógena PAT2002  
(F116L<sub>cts</sub>)



Se incubaron las cepas bacterianas a 30°C hasta el inicio de la fase exponencial (20-25U.K.), a continuación se mantuvieron los cultivos a 40°C durante 30 min. y finalmente se continuó la incubación a 37°C.

### 8. Conjugación entre J53 RP4 y PAT2002

Como se muestra en la tabla 7, la cepa de E. coli J53 tiene una mayor resistencia a los antibióticos: ampicilina, kanamicina y tetraciclina que la cepa de P. aeruginosa PAT2001 y Q1 de E. coli, dada por la presencia del plásmido RP4, lo cual se confirmó mediante la detección de la beta lactamasa excretada por la cepa portadora del RP4 (ver Material y Métodos). Se obtuvo un mutante espontáneo rif<sup>r</sup> de la cepa PAT2002, (marcador de contraselección) a una frecuencia de aparición de  $10^{-7}$ .

Con la finalidad de tener el plásmido RP4, en el cual se encuentra el Tn1, en la cepa PAT2002 rif<sup>r</sup> fué necesario hacer una conjugación entre la cepa donadora J53RP4 y la receptora PAT2002rif<sup>r</sup>. La frecuencia de aparición de exconjugantes Ap<sup>r</sup> fué de  $10^{-6}$ , siendo éstas capaces de crecer en tetraciclina, lo cual confirmó que recibieron el plásmido.

### 9. Transposición del Tn1 al genoma del bacteriófago F116Lcts

Se obtuvieron 22 lisógenas independientes PAT2002RP4 (F116 Lcts) como muestra en la tabla 8, las 22 colonias probadas eran lisógenas para el F116Lcts, siendo los controles las cepas no lisógenas PAT2002 y PAT2002RP4.

Con una de las 22 lisógenas, se obtuvo un lisado por inducción térmica. El fago obtenido fué filtrado y titulado sobre una cepa sensible, siendo el título de  $4.1 \times 10^{10}$  ufp/ml. Este fago se usó para transducir el marcador Ap<sup>r</sup> a la cepa PAT2002, seleccionándose colonias resistentes a este antibiótico. La frecuencia de transducción fué de  $6.0 \times 10^{-5}$ .

Se hizo una inducción en masa con las colonias transductantes y el fago obtenido se filtró y tituló sobre una cepa sensible, obteniéndose un título de  $8.8 \times 10^{10}$  ufp/ml, este se usó para transducir ampicilina a la cepa PAT2002, siendo la frecuencia de transducción de  $1.0 \times 10^{-4}$ .

TABLA 7

Resistencia a los antibióticos: ampicilina, kanamicina y tetraciclina de las cepas de E. coli J53 (RP4) y Q<sub>1</sub> y de P. aeruginosa PAT2002.

<u>Cepa</u>	<u>Ampicilina</u> (microgramos/ml)			<u>Kanamicina</u> (microgramos/ml)	<u>Tetraciclina</u> (microgramos/ml)
	<u>25</u>	<u>100</u>	<u>500</u>	<u>50</u>	<u>25</u>
J53 (RP4)	+	+	+	+	+
PAT2002	+	+	-	-	-
Q <sub>1</sub>	-	-	-	-	-

Cultivos saturados de cada cepa se diluyeron 1/200 en CN más el antibiótico a las concentraciones indicadas.

Se incubó a 37° C, 12 hrs.

+ = Crecimiento  
- = No crecimiento

TABLA 8

Confirmación de lisogenia para el bacteriófago F116Lcts.

<u>Cepa</u>	<u>Crecimiento a</u>		<u>Liberación de fagos</u>
	<u>40°C</u>	<u>30°C</u>	
PAT2002RP4 (F116L <u>cts</u> )	-(22/22)	+(22/22)	+(22/22)
PAT2002RP4	+( 8/8 )	+( 8/8 )	-( 8/8 )
PAT2002	+( 8/8 )	+( 8/8 )	-( 8/8 )

Las cepas se inocularon con un palillo estéril a 3 cajas de petri con AN, una sin tapiz de cepa sensible y las otras dos a 30°C durante 12 hrs.



10. Estabilidad del Tn1 en el genoma del bacteriófago F116  
Lcts

Los fagos obtenidos por la inducción en masa de lisógenas se usaron para ver la estabilidad del Tn1 en el genoma del F116Lcts, para lo cual, se obtuvieron lisógenas sobre la cepa PAT2002 en AN sin ampicilina.

Como se muestra en la tabla 9, el 100% de las cepas de - PAT2002 (F116LctsAp<sup>r</sup>) crecieron en ampicilina y liberaron fago, lo cual demuestra que el fago F116L tiene el Tn1 integrado en su genoma en forma estable, el control fué la cepa lisógena PAT2002 (F116Lcts).

TABLA 9

Estabilidad del transposon Tn1 en el genoma del bacteriófago F116Lcts.

<u>Cepa</u>	<u>No. de Cepas</u>	<u>Crecimiento en Ampicilina (0.75 mg/ml)</u>	<u>Liberación de fagos sobre un tapiz de PAT2002</u>
PAT2002 (F116L <u>cts</u> Ap <sup>r</sup> )	90	+(90/90)	+(90/90)
PAT2002 (F116L <u>cts</u> )	9	-( 9/9 )	+( 9/9 )

Las cepas se inocularon con un palillo estéril a 2 cajas con AN, la primera con 0.75 mg/ml de ampicilina y la segunda con un tapiz de PAT2002. Se incubó a 30° C, durante 12 horas.

#### IV. DISCUSION

El porcentaje de cepas clínicas lisógenas de P. aeruginosa fué del 87.5%, lo cual es congruente con lo reportado en la bibliografía (11), sin embargo, surge la cuestión planteada en la introducción acerca de qué factores determinan la alta frecuencia de lisogenia en este microorganismo, lo cual no es común en otros, ni aún en los de su mismo género. ¿Algunos de estos fagos pueden provocar conversión lisógena en la bacteria, o bien aumentar la virulencia de la cepa lisógena?. Son preguntas que se podrían plantear como nuevas pautas de investigación.

Se detectó al menos un fago transductor de los fagos aislados de cepas clínicas lo cual se esperaba, de acuerdo con el buen número de fagos transductores reportados para esta bacteria en la bibliografía (11). La frecuencia de transducción de este fago es similar a la reportada para los fagos transductores generalizados F116L y G101 de esta bacteria (11).

Sería importante averiguar si el fago 10 como transductor generalizado posiblemente tiene la capacidad de transducir in vivo resistencia a los antibióticos, lo cual podría contribuir a la adquisición de resistencias a estos agentes antimicrobianos en cepas clínicas de esta bacteria por transducción.

La mutagénesis in vitro con ácido nitroso usada con la finalidad de obtener mutantes claras en el fago 10 mostró ser una técnica eficaz ya que la frecuencia de aparición de mutantes claras en el tiempo óptimo (20 minutos) de tratamiento con este mutágeno fué al menos mil veces más alta que la espontánea, además de que las mutantes obtenidas por esta técnica son independientes una de otra, ya que la mutagénesis se realiza in vitro. La curva de letalidad obtenida

por este método en el fago 10 es comparable a la obtenida en otros fagos como la lambda de E. coli (26).

A partir de las pruebas de complementación se concluyó que existen al menos dos genes involucrados en la represión de las funciones líticas, el número de genes involucrados en esta función en otros fagos es mayor de 2, como es el caso de lambda en donde hay 3 genes y un promotor involucrados en dicha función (19).

El uso del fago F116L en lugar del 10 para continuar el trabajo se debió a que el primero, es uno de los fagos genética y bioquímicamente mejor conocidos de P. aeruginosa (11), sobre este fago se obtuvo una mutación cts a una frecuencia de  $10^{-5}$ , esta mutación mostró ser un buen marcador, ya que en la inducción de la lisógena PAT2002 (F116Lcts), el cultivo se lisó después del choque térmico al grado que en poco más de 5 horas de incubación tenía un valor de UK similar a la que tenía al empezar, por otro lado, el título del fago obtenido fué alto ( $10^{10}$  ufp/ml).

La conjugación hecha en este laboratorio entre una enterobacteria (E. coli) y una pseudomonácea (PAT2002), con la finalidad de tener el plásmido RP4 en esta última, es un proceso relativamente común, a pesar de que éste se realizó entre dos familias bacterianas diferentes. La importancia de este hecho radica en la posible difusión de resistencia a los antibióticos en cepas bacterianas por conjugación in vivo.

La metodología de la transposición del Tn1 al fago F116Lcts se basó en una serie de ciclos de infección-transducción que consistieron en infectar inicialmente una cepa de - - P. aeruginosa portadora del RP4 con el F116Lcts. Para permitir la transposición del Tn1 del RP4 al genoma del fago, esta lisógena se indujo aprovechando la mutación cts del fa

go. Los fagos obtenidos se usaron para transducir  $Ap^R$  a una cepa sensible a este antibiótico, seleccionando transductantes  $Ap^R$ . La frecuencia de transposición está comprendida entre  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  (22), por lo tanto, es de esperarse que en un solo ciclo de infección-transducción el número de fagos portadores del Tn1 sea bajo, por esto se hicieron dos ciclos más para aumentar la frecuencia de éstos con el Tn1 en su genoma.

Feiss et al (27) encontró que para el fago lambda el límite superior de la cantidad de ADN que puede ser empaquetado en partículas estables y funcionales se encuentra alrededor de 105% de ADN, sin embargo, el Tn1 representa aproximadamente, el 8% del ADN del F116Lcts y las partículas portadoras de éste, mostraron ser estables, esto sugiere que el F116Lcts puede encapsidar proporcionalmente más ADN que lambda, sin embargo, no podemos descartar que se haya generado una delección en el proceso de transposición.

Una nueva pauta de investigación, es ver en que segmento del genoma del F116L se integró el Tn1, para lo cual es necesario hacer un análisis de restricción del F116Lcts. El mapa por enzimas de restricción de este fago es conocido (28), así como también algunas de las enzimas de restricción que cortan sobre el Tn1 (23). La enzima Bam H1 es una buena candidata para saber de una manera aproximada donde se integró el Tn1.

El uso que se le puede dar a este fago transductor generalizado con una mutación termosensible en el represor y un marcador de resistencia a un antibiótico, es en el mapeo de marcadores en el genoma de P. aeruginosa mediante transducción y contransducción. La ventaja del marcador

de resistencia al antibiótico es en la selección de lisógenas, de las cuales se puede obtener el fago para transducir, mediante la inducción térmica de ésta, gracias a la mutación cts del fago. El F116LctsAp<sup>r</sup> se puede también usar como vehículo para realizar la transposición al genoma de la P. aeruginosa lo cual nos permitiría aislar mutantes por la integración del Tn1 en un gen bacteriano, en donde tendríamos un marcador de resistencia que nos permitiría mapear la mutación obtenida. Con la transposición también se pueden aislar deleciones o movilizar genes, como resultado de la formación de sitios de recombinación recíproca. La movilización de genes es de especial interés en esta bacteria, ya que existen problemas para mapear marcadores a partir del minuto 40 en el genoma de este organismo, debido a que la mayoría de los plásmidos usados para mapear por conjugación este genoma tienen un solo sitio de integración (17), ésto se puede corregir creando nuevos sitios de integración de un plásmido conjugativo en el cromosoma bacteriano mediante un proceso de recombinación mediada por un transposón en el ADN del plásmido y un transposón homólogo en el ADN bacteriano.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M. (1975) General Properties and Taxonomy of Genus Pseudomonas. En Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Editado por P.H. Clarke y M.H. Richmond John Wiley and Sons, pp. 1-37.
2. Costerton, J.W. (1979), Pseudomonas aeruginosa in nature and disease. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L.D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern - Stuttgart Vienna, pp 15-25.
3. Rhame, F.S. (1979), The Ecology and Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L.D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern - Stuttgart Vienna, pp 31-55
4. Favero, M.S. et al (1971). Pseudomonas aeruginosa - growth in distilled water from hospitals. Science 173: 836-838.
5. Lowbury E.J.L. (1975). Ecological Importance of Pseudomonas aeruginosa: Medical aspects. En Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Editado por P.H. Clarke y M.H. Richmond. John Wiley and Sons, pp. 37-67.
6. Bodey G.P. et al (1983). Infections causes by P. aeruginosa Rev. Infect Dis 5 (2): 270-313.
7. Pruitt, B.A. Jr. (1979). Infections of Burns and other wounds caused by Pseudomonas aeruginosa. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L.D. Sabath. Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna, pp. 55-71.



8. Hoiby M. (1977) P. aeruginosa infection in cystic fibrosis. Acta. Pthol. Microbiol. Scand Sect. C. Suppl.262
9. Rynolds, H.Y. et al (1975) P. aeruginosa infections: Persisting problems and current research to find new Therapies, Ann. Inter. Med. 82:819-831.
10. Chakrabarty A.M. (1976). Plasmids in Pseudomonas. Ann. Rev. Genet. 10:7
11. Holloway B.W., Krishnapillai V. (1975). Bacteriophages and Bacteriocins. En Genetics and Biochemistry of Pseudomonas. Editado por P.H. Clarke y M.H. Richmond John Wiley and Sons, pp. 99-132.
12. Cervantes V.C. y Sosa L.E. (1981). Análisis de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos en cepas de P. aeruginosa de origen clínico. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Microbiología, Mérida, Yuc. pp. 10
13. Richmond, M.H. (1979). Resistance of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Editado por L.D. Sabeth. Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna pp. 176-192.
14. Singer R.A. (1976) Lisogeny and Toxinogeny in Corynebacterium diphtheria. En Bacterial Toxinology. Editado por A.W. Bernheimer. John Wiley, Nueva York, pp. 1-30.
15. Tejedor, C., Foulds, J. Zasloff, M. (1982) Bacteriophages in sputum of Patients with Brouchopulmonay Pseudomonas infections. Infection and Immunity 36 (1): 440-441.



16. Goodenough, U. (1978). Genetics 2a. Edición Holt, Rinehart & Winston. 840.
17. Holloway B.W., Krishnapillai, V., and Morgan A.F. (1979) Chromosomal Genetics of Pseudomonas. Microbiological Reviews 43 (1): 73-102.
18. Methews, C. (1977). Reproduction of large virulent Bacteriophages. En Comprehensive Virology. 7 (3): 179-294.
19. Stent, S.G., Calendar, R. (1978). Molecular Genetics. An introductory narrative. 2a. edición W.H. Freeman and Company.
20. Krishnapillai, V. (1971). A novel transducing phage. Its role in recognition of a possible new host-controlled modification system in Pseudomonas aeruginosa. Mol. Gen. Genet. 114: 134-143.
21. Holloway, B.W. and P. van de Putte (1968). Lysogeny and bacterial recombination, p. 175-183. En W.J. Peacock y R.D. Brock (ed), Replication and recombination of genetic material. Australian Academy of Sciences, Canberra.
22. Lewin B. (1983). Genes. 1er. Ed. John Wiley & Sons. New York Chichester Brisbane Toronto Singapore.
23. Bukhani, A.I. Shapiro, J.A. Adgya, S.L. (eds) (1977). DNA Insertion elements, Plasmids and Episomes. Cold Spring Harbor Laboratory.
24. Klechner, N. Roth J. Botstein F. (1977). Genetic Engineering in vivo using translocatable drug-resistance elements. New methods in Bacterial Genetics. J. Mol. Biol. 116: 125-159.

25. Singer, E.R. Weil, J. (1968) Recombination in bacteriophage lambda mutants deficient in general recombination. *J. Mol. Biol.* 34:261.
26. Vaca, S. (1979). Observaciones sobre el comportamiento de IS1 e IS1 y del transposón Tn5 en el Bacteriófago Lambda. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. CINVESTAV.
27. Feiss, M. et al (1977) Packing of the bacteriophage lambda chromosome: Effect of chromosome length. *Virology* 77:282-293.
28. Caruso, M. Shapiro, J.A. (1982). Interactions of Tn7 and temperate phage F116L of Pseudomonas aeruginosa. *Mol. Gen. Genet.* 188:292-298.