

LA HERENCIA EXTRACROMOSÓMICA EN LAS BACTERIAS

Beatriz Eugenia Baca

Candelario Vázquez Cruz

Ygnacio Martínez Laguna

Centro de Investigaciones Microbiológicas

Instituto de Ciencias

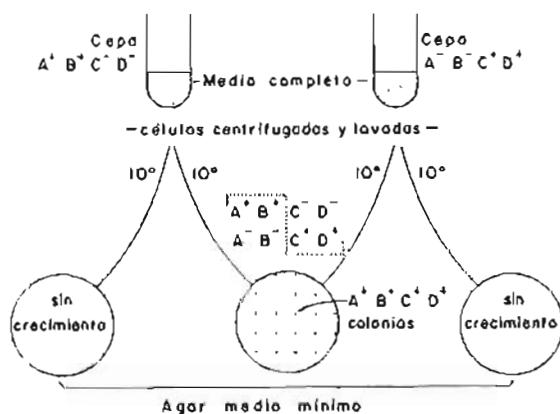
Universidad Autónoma de Puebla

En 1949 Joshua Lederberg y Edward L. Tatum, descubrieron que la bacteria del intestino *Escherichia coli*, presenta un fenómeno de intercambio de material genético al cual llamaron conjugación bacteriana. Para ello usaron dos mutantes que no crecían en un medio de cultivo "mínimo", ya que cada una de ellas era incapaz de producir dos diferentes aminoácidos. Sin embargo, cuando se sembraban juntas, algunas células descendientes de las originales crecían, siempre y cuando las cepas mutantes originales hubieran estado en contacto celular (véase figura 1). Este proceso se explicó a través de la transferencia de material genético de una bacteria donadora a otra receptora; esta última al recibir el ácido desoxirribonu-

cléico (DNA) lo incorporaba en su genoma heredándolo establemente a las células hijas. A este proceso se le denominó recombinación genética por conjugación bacteriana. No todas las células de *E. coli* podían realizar el proceso. La característica de bacteria donadora se explicó por la presencia de un material genético adicional del cromosoma bacteriano, que se denominó factor "F" por transferir "fertilidad", ya que únicamente las bacterias poseedoras del mismo podían realizar este proceso específico, de recombinación genética^{5,6}. Por estos descubrimientos Lederberg y Tatum recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1958.

La presencia de este DNA adicional en *E. coli*, fue evidenciada por técnicas de separación de material biológico; una de ellas denominada centrifugación en gradiente de densidad al equilibrio, en la cual las moléculas se separan de acuerdo con su densidad. Para ello, un extracto libre de células se coloca en una solución con un gradiente de densidad, y se centrifuga a alta velocidad; esto hace que las moléculas emigren en la solución hasta que el medio que las rodea sea de la misma densidad que la molécula. De esta forma se separó el DNA cromosómico del factor F. Posteriormente por microscopía electrónica, se estudiaron tanto el DNA cromosómico, como el del factor F. Actualmente contamos con una técnica sencilla para detectar este material genético: la electroforesis en geles de agarosa. Esta

FIGURA 1



Representación esquemática del experimento de Lederberg y Tatum (1949). Las mutantes fueron cultivadas en un medio que incluía los factores requeridos para su crecimiento A, B, C, y D; para determinar la frecuencia de reversión, se desarrollaron en un medio mínimo al que le faltaban estos factores.

técnica se basa en el hecho de que las moléculas como el DNA tienen, en ciertas condiciones, una carga eléctrica. Esto determina que al aplicar corriente eléctrica, las moléculas de DNA migren hacia el polo positivo, separándose de acuerdo con su masa molecular. Con esta técnica es posible separar el DNA cromosómico del extracromosómico, debido a que el primero es de mayor tamaño. Una vez separadas estas moléculas se tinge el gel con un colorante que se intercala entre las bases del DNA; cuando se aplica luz ultravioleta el colorante fluoresce mostrando la presencia del DNA. De esta manera es posible visualizar el DNA extracromosómico presente en la célula bacteriana. Este material genético adicional recibió posteriormente el nombre de plásmido.

Se ha caracterizado a los plásmidos como moléculas de DNA bacteriano de doble cadena, circular, covalentemente cerrado (CCC), aunque en algunas especies se han encontrado como DNA lineal. Constituyen a veces sólo una pequeña parte del genoma celular (1%), aunque en otros casos llegan a representar hasta un 30% y determinan ras-

gos accesorios, pero importantes no codificados usualmente por el cromosoma bacteriano. Se consideran endosimbiontes (partículas simbióticas), ya que no presentan una etapa extracelular, portan la información para el control de la duplicación de su DNA, y son heredados como unidades genéticas, físicamente independientes del cromosoma bacteriano. Su replicación desde el punto de vista bioquímico depende de la maquinaria proteica codificada por el hospedero. A menudo la célula se beneficia de un aporte de funciones genéticas adaptativas, como la resistencia a muchos tóxicos, cualidad que permite a la célula bacteriana desarrollarse en un medio adverso. En algunos casos estas funciones están implicadas en la generación de enfermedades infecciosas en el hombre, animales y plantas; permiten que la célula hospedera se nutra a partir de sustancias complejas, al codificar para la maquinaria enzimática adecuada para degradarlas. En la tabla I se anotan algunas de las funciones que son codificadas por los plásmidos.

Cuando se describió por vez primera la presencia de este DNA extracromosómico se pensó que sólo algunos géneros bacterianos los contenían. Sin embargo, hasta ahora se han encontrado en todos los tipos de bacterias, archibacterias y cianobacterias en que se han buscado. Se sabe también que una misma bacteria puede ser portadora de varios plásmidos y cada plásmido puede albergar una o varias copias.

Funciones codificadas por plásmidos

Una de las funciones que ha sido más estudiada y disseminada entre las diferentes especies de bacterias, es la resistencia que pre-

TABLA I
Algunas funciones codificadas por plásmidos

Función	Microorganismo
Fertilidad	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Transferencia de material genético.	<i>Streptomyces</i>
Resistencia a los antibióticos.	Muy diseminada
Resistencia a metales pesados: Hg, Cr, Pb.	Muy diseminada
Producción de bacteriocinas.	Muy diseminada
Producción de enterotoxinas.	<i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Degrado de hidrocarburos antraceno, xileno, tolueno.	Varias especies del género <i>Pseudomonas</i> .
Fijación biológica de nitrógeno	<i>Rhizobium</i>
Tumorogénesis en plantas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Pseudomonas savastanoi</i>

sentan los microorganismos a la acción de los antimicrobianos. En 1952, Watanabe y colaboradores aislaron de pacientes con disentería bacilar, una cepa de *Shigella dysenteriae* multirresistente a los antibióticos de elección, para el tratamiento de esta infección (ampicilina, cloranfenicol y estreptomicina). Esta multirresistencia resultó ser transferible por conjugación a *E. coli*; lo cual sugería que estaba codificada por un plásmido presente en *Shigella dysenteriae*. A partir de este hallazgo se ha detectado en cepas de origen clínico la presencia de plásmidos, a los cuales se les ha dado el nombre de plásmidos R, por conferir resistencia a los antibióticos.

Esta transferencia ha sido encontrada en bacterias de la misma especie y género, aunque también en microorganismos de géneros diferentes. Este es un claro ejemplo de diseminación de información genética horizontal.

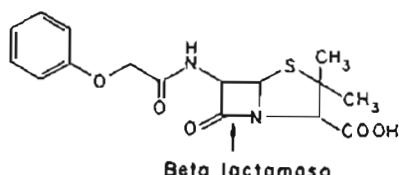
Los plásmidos R pueden codificar para la resistencia a un grupo de antibióticos, ya tengan éstos estructuras químicas similares o diferentes, esto sugiere la presencia de varios mecanismos de inactivación del antibiótico. Por ejemplo el caso de los beta-lactámicos, penicilinas y cefalosporinas, la resistencia bacteriana a estos antibióticos es mediada por una enzima, que es capaz de hidrolizar el anillo beta-lactámico inactivando la molécula. La información para la síntesis de esta enzima llamada beta lactamasa, es portada en plásmidos. En relación a los aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, gentamicina, amikacina, etcétera), la inactivación del antibiótico involucra a tres tipos diferentes de modificación enzimática: acetiltransferasa (introduce un grupo acetilo a la molécula de antibiótico), fosforilasa (inserta un grupo fosfato), y nucleotidil-transferasa (transfiere un grupo nucleotídico al antibiótico). Actualmente se han caracterizado también varias enzimas (alrededor de doce), que actúan sobre grupos hidroxilo y/o amino que forman parte de los amino-

glucósidos (véase figura 2). La información para la biosíntesis de estas enzimas es igualmente codificada por plásmidos. Otros ejemplos de modificación enzimática se relacionan con la resistencia al cloranfenicol y al trimetoprim. Las cepas aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria, resistentes a varios antibióticos a la vez, ha significado un serio problema ya que limita al médico, en la

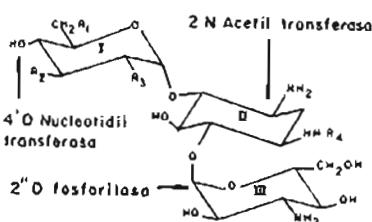
elección del antibiótico adecuado para el tratamiento de la infección. Con el uso masivo e indiscriminado de los antibióticos se han seleccionado cepas multirresistentes con una frecuencia cada vez mayor. La resistencia bacteriana ha demostrado ser transferible por conjugación, en el laboratorio *in vitro*, así como también *in vivo*, en la piel y líquidos biológicos como la orina y pus².

El estudio de los plásmidos en bacterias, ha contribuido a profundizar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad y virulencia de los microorganismos. *E. coli*, *Shigella* y *Yersinia*, son bacterias causantes de infecciones diarréicas. Se ha estimado que *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es responsable de alrededor de seiscientos millones de casos de infecciones diarréicas anualmente en el mundo, con setecientas mil muertes en niños menores de 5 años de edad³. ETEC secreta dos enterotoxinas que producen la secreción de iones y agua a la luz intestinal, conduciendo a la diarrea por secreción de líquidos. Estas toxinas denominadas LT por termolábil y ST por ter-

FIGURA 2



Estructura de la penicilina y sitio de inactivación por beta-lactamasa.



Estructura de la kanamicina; ésta es inactivada por acetilación del grupo amino (2N), por una acetiltransferasa, fosforilación del grupo 2'' OH, por una fosforilasa y adenilación del 4' OH por una nucleotidil transferasa.

moestable, son moléculas de naturaleza proteica, cuyo mecanismo de acción es a través de la activación de la adenilato ciclase y de la guanilato ciclase respectivamente. La información para la síntesis y secreción de ambas toxinas está codificada por plásmidos llamados ENT. Estudios realizados en nuestro laboratorio, en cepas aisladas de niños con diarrea han mostrado la presencia de plásmidos que codifican para la producción de la toxina ST y para la resistencia a varios antibióticos¹.

Otro tipo de *E. coli* diarreogénica, la *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), es una bacteria invasiva. EIEC causa una disenteria bacilar semejante a la producida por las especies de *Shigella*. Al igual que estas últimas, la EIEC invade el epitelio intestinal y se multiplica intracelularmente. Los microorganismos son localizados en la lámina propia. El fenotipo invasivo de las especies de *Shigella* y EIEC es dependiente de una región de 37 kb (kilopares de bases), localizada en un plásmido de 120-140 MDa, llamado invasivo pINV⁸. Los estudios hechos en *Shigella* han demostrado que dentro de esta región son necesarios varios sitios para la invasión; estos incluyen un grupo de genes denominados *ipa*, (*invagination protein antigen*) los cuales codifican para varias proteínas asociadas a la membrana externa del microorganismo, que están implicadas en las interacciones célula hospedera-microorganismo. La penetración a la mucosa intestinal es necesaria para que las especies de *Shigella* y EIEC desencadenen el proceso mórbido; la penetración a la mucosa epitelial se ha identificado como un mecanismo de virulencia⁴.

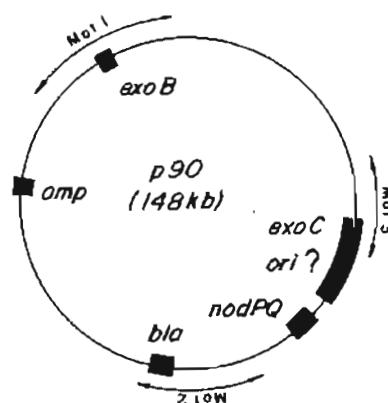
En bacterias cuyo *habitat* natural es el suelo, también se han descrito plásmidos, relacionados con la interacción microorganismo-planta. El ejemplo más estudiado por su importancia en la agricultura, es el de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*⁹.

Rhizobium es un microorganismo

fijador de nitrógeno, es decir, contiene la información genética para biosintetizar la enzima nitrogenasa, enzima que cataliza la transformación del nitrógeno molecular en amoniaco, el cual a través de una serie de reacciones, puede ser asimilado por la planta para su nutrición. Para que esto suceda, la bacteria debe infectar a la planta hospedera en la raíz y formar unas estructuras diferenciadas llamadas nódulos. Las bacterias reciben de la planta el carbono y la energía necesarias para la fijación de nitrógeno, a cambio de ello la bacteria le proporciona nitrógeno en forma de nutrientes que son asimilados posteriormente por la planta. Los genes responsables de este proceso se denominan *nif* por fijación de nitrógeno, y son los genes responsables de la síntesis de la nitrogenasa y su regulación⁹; además están los genes *nod*, responsables del proceso de inducción de la formación del nódulo. Estos genes están localizados en plásmidos.

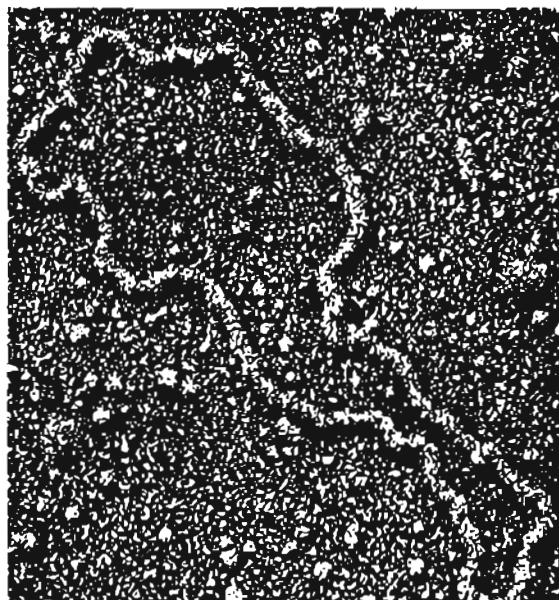
Otro género bacteriano que en los

FIGURA 3



Carta física del plásmido presente en la cepa de *Azospirillum brasiliense* Sp7 p90Rhico. En ella se localizaron los siguientes loci genéticos: *nodPQ*, es el locus implicado en la síntesis de una molécula señal; *bla*, determina la síntesis de la beta-lactamasa tipo R-TEM; *Ap*, es un segundo gene que confiere resistencia a la ampicilina; *exo B* y *exo C*, son los loci que funcionalmente complementan las mutaciones en la síntesis del exopolisacáridos; *ori*, es necesario para mantener el plásmido como un replicón independiente; *mot1*, *mot2*, *mot3*, están involucrados en la producción de flagelos.

últimos años ha captado la atención de muchos científicos a nivel internacional, es *Azospirillum*. Este microorganismo también fijador de nitrógeno, productor de fitohormonas, se ha aislado en estrecha asociación con raíces de plantas gramíneas de interés agronómico, como maíz, trigo, caña de azúcar y pastos forrajeros. Cuando este microorganismo se inocula a la planta, promueve el desarrollo del sistema de la raíz, aumento de los pelos radiculares y de la incorporación de agua y minerales, proporcionando un mejor estado nutritivo en la planta hospedera. El efecto benéfico se ha atribuido a la producción de fitohormonas como la auxina ácido indol acético (AIA) por el microorganismo. Al igual que otras bacterias del suelo, *Azospirillum* contiene plásmidos de alto peso molecular. En varias cepas se ha encontrado que presentan plásmidos de varios cientos de MDa, lo que indicaría un importante potencial genético adicional. Uno de estos plásmidos, aislado en una cepa de *Azospirillum brasiliense* ha sido estudiado a nivel molecular; en la Figura 3 se muestra su carta física⁷. En él se han localizado regiones asociadas con la interacción microorganismo-planta, como son los genes responsables de la síntesis de un exopolisacárido de la pared celular de *Azospirillum*, implicado en la adherencia de la bacteria a las raíces. Genes involucrados en la producción de una molécula señal relacionada con el establecimiento de la bacteria en las raíces; y genes responsables de la biosíntesis de los flagelos, que le permiten moverse y dirigirse hacia las raíces de la planta. Todas las cepas de *Azospirillum* aisladas hasta el momento, han mostrado ser resistentes a las penicilinas y cefalosporinas. Esta resistencia es mediada por enzimas beta-lactamasas⁷, cuya síntesis es codificada por este plásmido, el cual muestra una amplia distribución, ya que se ha detectado en varias cepas de *Azospirillum brasiliense*, aisladas en Senegal, Brasil, Francia y tam-

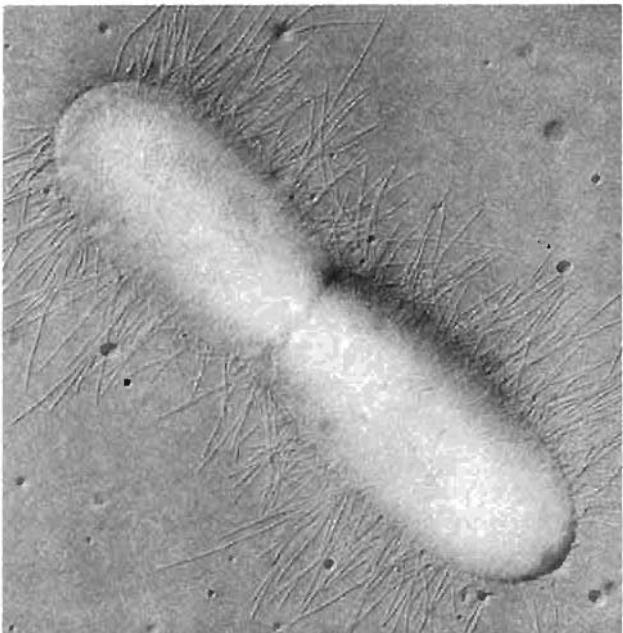


Micrografía electrónica del plásmido de *Escherichia coli*.

bien en México.

Muchos géneros producen antibióticos de naturaleza proteica, que inhiben el desarrollo de géneros relacionados, pero que son inactivos contra las cepas que las producen. Estas moléculas denominadas bacteriocinas son codificadas por plásmidos y han sido descritas en cepas de *Azospirillum brasiliense*¹⁰. Estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren la presencia de plásmidos bacteriocinogénicos en esta especie¹¹. Este es un importante mecanismo de antagonismo que se gesta entre bacterias, en un sistema ecológico tan competitivo como es la rizósfera (suelo que rodea las raíces de la planta). Aquellos microorganismos que sinteticen bacteriocinas contarán con una ventaja selectiva que les permita sobrevivir y colonizar la raíz. El análisis de las funciones codificadas por plásmidos en bacterias aisladas del suelo, tiene y tendrá cada vez más una utilización práctica mayor, ya que permitirá su empleo como fertilizantes biológicos en la agricultura, con ventajas en relación a los fertilizantes químicos, debido a que los primeros no contaminan, son más baratos y más fáciles de obtener.

Los estudios básicos de la estructura y función de los plásmidos han contri-



Micrografía electrónica de la bacteria *Escherichia coli*

buido en el diseño de los vehículos de clonación, herramienta fundamental para el desarrollo de la ingeniería genética. Un vehículo de clonación es un plásmido R pequeño, los determinantes de resistencia, usualmente dos, permiten la fácil detección de la bacteria que lo contiene. Estos plásmidos son de fácil manipulación en el laboratorio; uno de los que más se emplea para clonar el DNA, es el diseñado por Bolívar y colaboradores, el plásmido pBR322, que confiere la resistencia a la ampicilina y tetraciclina, con varios sitios únicos para corte con endonucleasas de restricción; enzimas que cortan el DNA en sitios específicos, localizados precisamente en los genes que median la resistencia, de tal manera que al cortar con la enzima de restricción, el plásmido se lineariza, pudiendo ligarlo con otro DNA que haya sido cortado con la misma enzima. Este plásmido llega a tener hasta cien copias de él mismo en la célula, lo que permite la amplificación del DNA clonado.

Como puede verse, el avance de la biología molecular de los plásmidos abre múltiples perspectivas que permitirán su adecuada utilización en áreas tan

importantes como la medicina, y la agricultura.

Bibliografía

¹Baca, B.E., Martínez Laguna, Y., Arenas Hernández, M.M.P. y Vázquez Fernández, B.A., Características de transferencia y estabilidad de los plásmidos presentes en cepas de *E. coli* enterotoxigénica, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 32, 1990, pp. 57-63.

²Guiney, D. G., Promiscuous transfer of drug resistance in Gram-negative bacteria, *Journal Infectious Diseases*, Vol. 149, 1984, pp. 320-329.

³Institute of Medicine 1986, New vaccine development: establishing priorities, en *Diseases of importance in developing countries*, National Academic Press, Vol. II, Washington D.C. 1986, pp. 159-169.

⁴Larry, T., Genetic basis of virulence in *Shigella* species, *Microbiological Reviews*, Vol. 55, 1991, pp. 206-224.

⁵Lederberg, J., Bacterial variation, *Annual Review of Microbiology*, Vol. 3, 1949, pp. 1-22.

⁶Lederberg, J., Genetic recombination in bacteria: a discovery account, *Annual Review of Genetics*, Vol. 21, 1987, pp. 23-46.

⁷Onyeocha, I., Vieille, C., Zimmer, W., Baca, B.E., Palacios, R., Flores, M. y Elmerich, C., Physical map and properties of a 90 MDa plasmid of *Azospirillum brasiliense* Sp7, *Plasmid*, Vol. 23, 1991, pp. 169-182.

⁸Small, P. L. C. y Falkow, S., Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into HEp-2 cells, *Infection and Immunity*, Vol. 56, 1988, pp. 225-229.

⁹Stacey, G., Burris, R. H., y Evans, H.J., *Biological Nitrogen Fixation*, New York, 1992.

¹⁰Tapia Hernández, A.R., Mascarúa Esparza, M.A. y Caballero-Mellado, J., Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasiliense*, *Microbios*, Vol. 64, 1990, pp. 73-83.

¹¹Vázquez Cruz, C., Tapia Hernández, A.R., Mascarúa-Esparza, M.A., Caballero-Mellado, J. y Baca, B.E., Plasmid profile modification after elimination of bacteriocin activity in *Azospirillum brasiliense* strains, *Microbios*, Vol. 69, 1992, pp. 195-204.