

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE DOCENCIA DE GENÉTICA I



Guía de Prácticas de Genética I

Prof. Luis Andrés Yarzabal

MERIDA, Octubre del 2006.

CONTENIDO

Prólogo

Problemas de genética mendeliana.....	1
Los microorganismos en la investigación científica.....	5
Nomenclatura genética.....	24
Conociendo un poco más a <i>E. coli</i>	26
<i>E. coli</i> vista por J. Lederberg.....	29
Crecimiento bacteriano.....	31
Conjugación bacteriana.....	35
Transducción.....	52
Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	63
Electroforesis de ácidos nucleicos.....	64
Transformación bacteriana.....	68
Anexo 1. Composición de medios de cultivo.....	78
Anexo 2. Sitios Internet recomendados.....	80

Prólogo.

De manera tradicional, los trabajos prácticos de Genética I han estado orientados hacia el estudio de la genética de bacterias y de fagos, todo un mundo en sí mismo, mientras que la genética de organismos eucariotas, diploides, ocupa una gran parte del curso teórico. Debido a ello, existe un desfase entre la materia impartida en el curso teórico de Genética I y los fenómenos cuya existencia se pone en evidencia en el laboratorio del mismo curso. Esto nos ha motivado a implementar estrategias didácticas que nos permitan introducir al estudiante en los aspectos teóricos de los fenómenos que se estudian en el laboratorio y, de manera prácticamente simultánea, realizar los experimentos que permitan poner en evidencia tales fenómenos. Por esta misma razón, y tomando en cuenta la necesidad de contar con un manual adecuado que oriente el trabajo de los estudiantes en el Laboratorio de Genética I, nos hemos dado a la tarea de actualizar, corregir, ilustrar y completar el material de apoyo que se encontraba disperso y que se venía utilizando desde hace unos cuantos años sin haber sido revisado.

En efecto, la información bibliográfica que mejor se adapta a las necesidades de este curso práctico se encuentra dispersa en diferentes libros, manuales, revistas e, inclusive, páginas web en Internet. Es por ello que hemos optado por organizar de manera sistemática toda esta información, a partir de material bibliográfico obtenido de diferentes fuentes, para presentarlo a nuestros estudiantes bajo la forma de un Manual Práctico. En los casos en los que ha sido posible, hemos señalado claramente la referencia bibliográfica a partir de la cual se ha obtenido dicho material. Mención especial merece la Prof. Mariemma Ortega de López, quien redactó las versiones originales de muchos de estos trabajos prácticos.

Debo agradecer la ayuda de la Prof. Lenys Buela (Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia), quien ha elaborado los protocolos gráficos que se incluyen al final de cada práctica. Igualmente quiero agradecer a la Br. Arlés Urrutia, preparadora del curso de Genética I durante varios años, quien transcribió parte del material que se incluye en la presente guía.

Prof. Luis Andrés Yarzabal

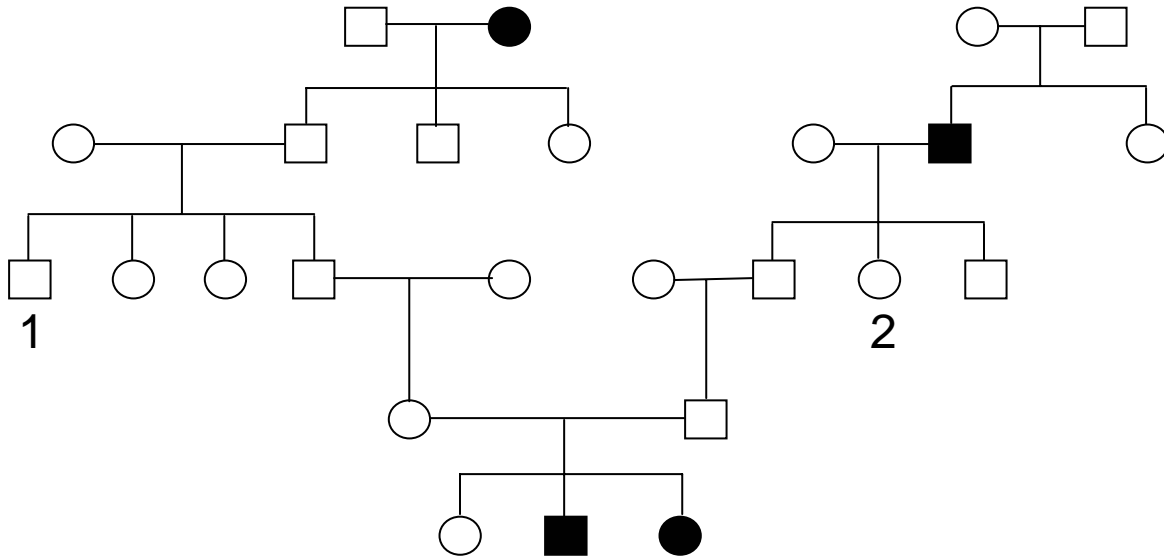
Problemas de Genética Mendeliana

Cruces monohíbridos.

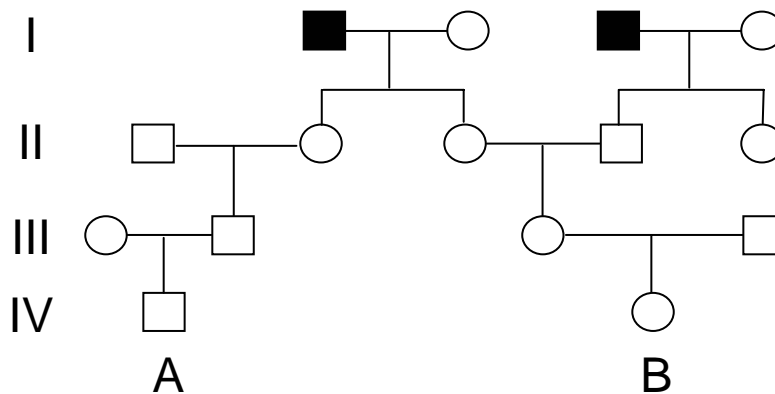
- 1) En el guisante de jardín, *Pisum sativum*, el tallo alto es dominante sobre el enano. Suponga el cruce entre un parental (P) de genotipo homocigoto dominante y el otro homocigoto recesivo y, luego, el cruce entre individuos F1. Represente mediante un esquema el patrón de la herencia para este carácter, señalando el tipo de gameto que debería producir cada participante y su proporción relativa en los cruces (utilice el cuadrado de Punnett). a) ¿cuál es el genotipo y fenotipo probable de los descendientes de las generaciones F1 y F2?; b) suponga que la generación F2 está integrada por un total de 90 plantas, ¿qué cantidad de plantas esperaríamos encontrar de cada fenotipo, con cuál frecuencia y porcentaje? Mencione el principio mendeliano que explica las proporciones observadas en las diferentes generaciones.
- 2) En los zorros, el color del pelaje negro-plateado está determinado por un alelo recesivo, y el color rojizo por el alelo dominante del mismo gen. Prediga las proporciones genotípica y fenotípica en la generación F1 para cada uno de los siguientes cruces: a) rojo homocigoto × rojo heterocigoto; b) rojo heterocigoto × negro-plateado; c) rojo homocigoto × negro-plateado; d) rojo heterocigoto × rojo heterocigoto. ¿De qué manera el principio mendeliano de segregación independiente explica la proporción genotípica observada en los descendientes de los diferentes cruces? ¿De qué manera explica la proporción fenotípica?
- 3) En los cobayos, el pelo negro es dominante sobre el blanco. a) Represente mediante un árbol genealógico el patrón de herencia de este carácter, considerando la siguiente información: suponga que en el cruce entre dos parentales negros, los descendientes de la primera camada son negros y blancos en la proporción 3:1 respectivamente. b) si se cruzan dos descendientes negros (al azar) y los descendientes de este cruce son todos negros, ¿cuáles son los genotipos probables de los descendientes F2? c) ¿qué tipo de cruce debe realizar para comprobarlo y cuáles resultados esperaríamos obtener?
- 4) En los conejos, el pelo corto es dominante sobre el pelo largo. Suponga que dos conejos de pelo corto, escogidos al azar, son apareados y producen una descendencia compuesta por 10 conejos de pelo corto y 3 de pelo largo. a) deduzca el genotipo de los parentales y los descendientes F1; b) ¿cuál es la proporción genotípica probable de los descendientes de pelo corto?; c) ¿cuál es la proporción de los genotipos homocigoto y heterocigoto?; d) calcule la probabilidad de que los descendientes sean de genotipo heterocigoto u homocigoto; e) calcule la probabilidad de que los descendientes de pelo corto sean de genotipo heterocigoto.
- 5) Suponga que cuando dos conejos de pelo corto, escogidos al azar, son cruzados entre sí, los descendientes de la primera generación se encuentran en una proporción genotípica 1:1. a) deduzca el genotipo de esos descendientes; b) calcule separadamente la probabilidad de que en una segunda camada de ese mismo cruce aparezcan descendientes de genotipo homocigoto, heterocigoto, homocigoto o heterocigoto.
- 6) Suponga que dos cobayos de pelo negro y genotipo heterocigoto se aparean. Calcule la probabilidad de que el primer descendiente en cada una de las tres primeras camadas sean, secuencialmente: blanco, negro, blanco-negro-blanco, blanco-negro-negro, negro-negro-blanco, blanco-negro-negro, negros o blancos, ni negros ni blancos.

Análisis de pedigrí (árbol genealógico)

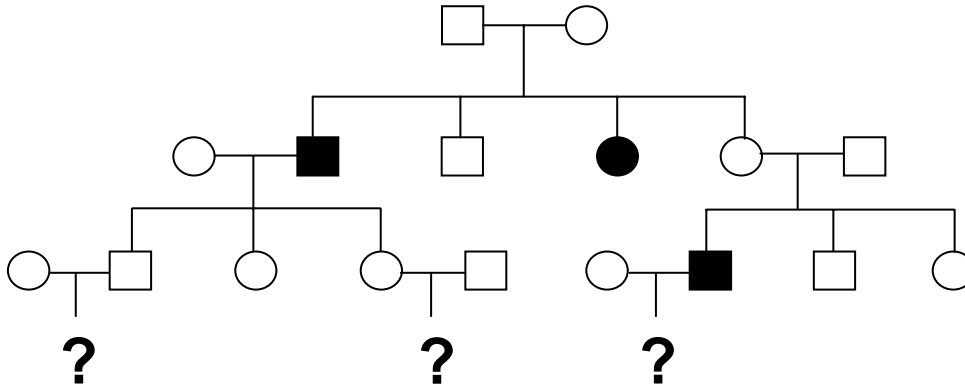
- 7) Considere el siguiente árbol genealógico, relacionado con la herencia de una enfermedad del riñón muy poco frecuente. Calcule cuál es la probabilidad de que el primer hijo del cruce 1 × 2 sufra la enfermedad.



- 8) La fenilcetonuria es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente. En base al análisis del siguiente árbol genealógico, calcule: a) la probabilidad de que el primer hijo de A × B sufra la enfermedad; b) si el primer hijo es normal, ¿cuál será la probabilidad de que el segundo sufra la enfermedad?; c) si el primer hijo es enfermo, ¿cuál es la probabilidad de que el segundo hijo sea normal?



- 9) El siguiente pedigrí se refiere a cierta enfermedad rara que provoca incapacidad pero no es mortal



- a) determine el modo de herencia más probable de esa enfermedad; b) indique el genotipo de cada individuo de acuerdo con su propuesta de modo de herencia; c) si fuera el médico de familia, cómo aconsejaría a las 3 parejas de la tercera generación sobre la probabilidad de tener un hijo afectado?

Cruces dihíbridos.

- 10) En el cerdo, el fenotipo normal de pazuña hendida está determinado por el alelo recesivo m , y el fenotipo pata de mula por el alelo dominante M . El alelo recesivo b determina el color del pelaje negro y el dominante B el color blanco. En los cruces entre parentales de genotipo doble homocigoto dominante \times doble homocigoto recesivo, los descendientes F_1 son siempre doble heterocigotos. a) ¿cuál es el genotipo y el fenotipo probables de los parentales y los descendientes F_1 ? b) qué tipo de gametos deben producir estos descendientes y en qué proporción? c) la proporción fenotípica en la F_2 es de 9:3:3:1, d) ¿de qué forma se están distribuyendo los dos genes M y B ? e) cómo se están transmitiendo los caracteres forma de la pazuña y color del pelaje?
- 11) Mendel observó que en el guisante de jardín, los cotiledones podían ser de color amarillo o verde y que las semillas podían ser lisas o rugosas. Suponga que cuando ambos caracteres fenotípicos (color y forma) son considerados en los descendientes de dihíbridos autofecundados, se obtuvieron los siguientes resultados: 193 verde-lisos, 184 amarillos-rugosos, 556 amarillos-lisos y 61 verdes-rugosos. a) ¿cuál es el genotipo probable de los parentales y descendientes? b) compare las proporciones fenotípicas observadas con las predicciones mendelianas; c) calcule la probabilidad esperada para cada uno de los fenotipos.

Cruces Polihíbridos.

- 12) Considere que en los seres humanos el cabello rubio, la piel clara, los ojos claros, la contextura delgada y la estatura alta son caracteres determinados por los alelos recesivos de 5 genes autosómicos de comportamiento mendeliano. Cuál será la probabilidad de que un matrimonio de individuos heterocigotos para los 5 genes considerados tenga un primer hijo con las siguientes características: rubio, gordo, bajito, de ojos claros y piel morena?

Alelos múltiples.

- 13) Varios sistemas de grupos sanguíneos se han identificado en el ser humano, siendo el AOB uno de los más estudiados por su importancia en las transfusiones de sangre. En este sistema, un solo gen con tres alelos I^A , I^B e i determina la aparición de los 4 grupos A, B, AB y O, como resultado de las posibles combinaciones alélicas. En base a esta información, diga a) ¿cuál será el genotipo probable de los progenitores para que tengan hijos de los 4 grupos sanguíneos?, b) ¿es procedente pensar en un caso de paternidad discutida para un hijo que haya nacido con el grupo O y por qué?
- 14) Los grupos sanguíneos M, N y MN está determinados por dos alelos, L^M y L^N . EL grupo sanguíneo Rh+ (Rhesus positivo) se debe al alelo dominante R de un gen distinto. En un juicio en el que se debate una disputa de paternidad, dos hombres reclaman a 3 niños como suyos. Los grupos sanguíneos de los hombres, los niños y su madre eran los siguientes:

Marido	O	M	Rh+
Amante	AB	MN	Rh-
Mujer	A	N	Rh+
Hijo 1	O	MN	Rh+
Hijo 2	A	N	Rh+
Hijo 3	A	MN	Rh-

Puede establecerse la paternidad de los niños con esta información?

- 15) En algunos sistemas de incompatibilidad de plantas, la compatibilidad del polen está determinada por el genotipo diploide del parental masculino. En estos sistemas, se produce con frecuencia dominancia entre los alelos S, no sólo en las plantas masculinas sino también en las femeninas. Supongamos que la serie de dominancia es $S_1 > S_2 > S_3 > S_4$. Por tanto S_1S_2 es de tipo 1, S_3S_4 de tipo 3 y así sucesivamente. Asumimos que la compatibilidad sólo es posible entre tipos diferentes. La descendencia del cruzamiento $S_1S_2 \times S_3S_4$ se cruza entre sí, en todas las combinaciones posibles. ¿Cuál será la proporción de cruzamientos compatibles? ¿Cuál será la descendencia de estos cruzamientos compatibles?

Interacciones génicas.

- 16) La forma en la cresta de gallina es un ejemplo clásico en el cual un mismo carácter fenotípico está determinado por más de un gen, capaces de interactuar de manera tal que dan lugar a la aparición de ciertos cambios en las proporciones fenotípicas mendelianas. Así tenemos las gallinas con cresta en roseta (gen R), guisante (gen P), nuez (R_P) ó normal (rrpp). Cuando se cruzan gallinas de genotipo doble homocigoto cresta en roseta x cresta en guisante, todos los descendientes F1 tienen la cresta en forma de nuez. Si estos descendientes se cruzan entre sí, la proporción fenotípica en la F2 es 9:3:3:1. a) ¿qué clase de interacción génica está ocurriendo y por qué?, b) cómo se explica el resultado obtenido en F2, sabiendo que la forma de la cresta no es un caracter mendeliano?
- 17) El color de las flores del guisante de jardín *Lathyrus odoratus*, está determinado por la presencia de dos genes distintos. Al cruzar plantas con flores blancas procedentes de dos variedades de raza pura diferentes, todos los descendientes F1 son plantas con flores moradas. Suponga que cuando estos descendientes se cruzan entre sí, aparecen 53 plantas con flores moradas y 43 con las flores blancas. a) ¿cuál es el genotipo probable de los parentales y descendientes F1 y F2?, b) cómo se explica la proporción fenotípica observada en la F2? c) qué clase de interacción está ocurriendo entre los dos genes y por qué?

LOS MICROORGANISMOS EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

INTRODUCCION

Los microorganismos (bacterias y virus) ofrecen una serie de ventajas para el estudio de los principios básicos de la genética, si consideramos características tales como su pequeño tamaño, su haploidía (monoploidía), la facilidad de su manipulación, su rápida reproducción (corto tiempo generacional) y el gran número de descendientes obtenidos a partir de una sola célula (ó virion, en el caso de los bacteriófagos). Cuando son considerados colectivamente los microorganismos poseen una amplia diversidad de características que permiten comprender, ilustrar y modelar sistemas más complejos.

Las bacterias utilizadas en los laboratorios de genética y biología molecular poseen una gran versatilidad bioquímica y fisiológica, mecanismos parasexuales de intercambio de genes, facilidad de cultivo, conservación y experimentación; de igual forma, la posibilidad de obtener resultados con poblaciones mayores a los 10^8 individuos por experimento, permite realizar observaciones estadísticamente significativas. La especie bacteriana utilizada con mayor frecuencia en los laboratorios de genética es, sin lugar a dudas, *Escherichia coli* (**Figura 1**). Esta especie procarionta se reproduce por fisión binaria y posee un único cromosoma circular. Aunque se trata de un organismo haploide, puede albergar copias adicionales de ciertos genes, dependiendo de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre y convertirse así en un diploide parcial (merodiploide). Ciertas cepas de *E. coli* han sido manipuladas genéticamente, con el fin de incorporar en su genoma diferentes mutaciones que facilitan la puesta en evidencia de determinados fenómenos genéticos.

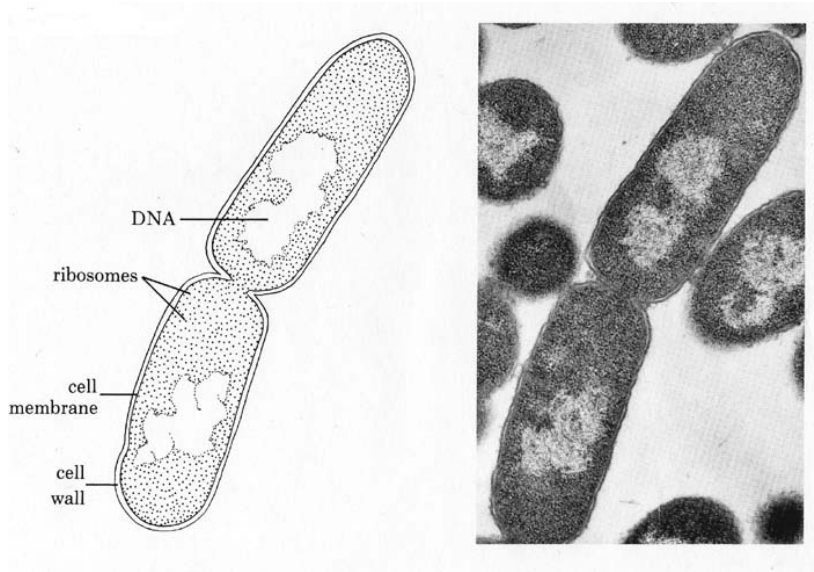
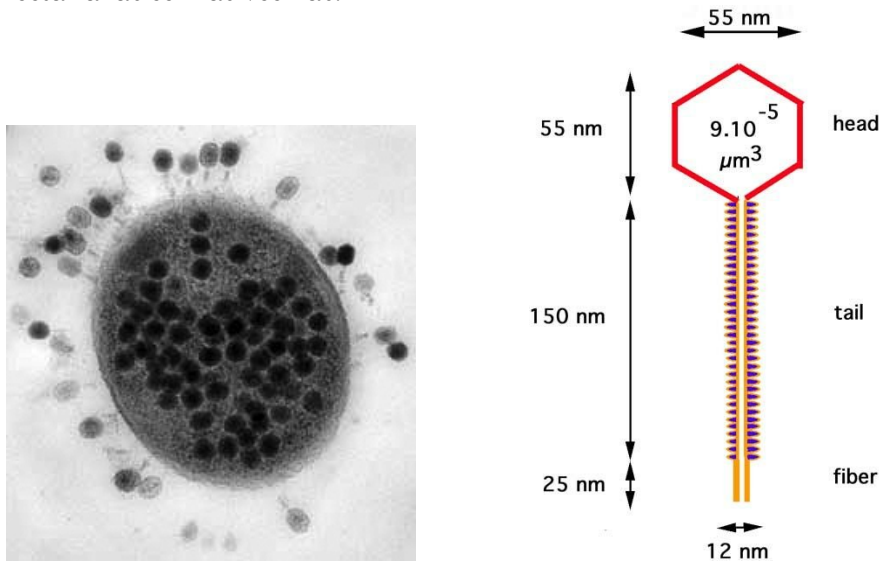


Figura 1: Microfotografía electrónica de una célula bacteriana en división.

Los bacteriófagos son otro tipo de microorganismos ampliamente utilizados en los laboratorios de genética (**Figuras 2 y 3**). El fago T2, por ejemplo, se empleó en el experimento que ayudó a dilucidar la naturaleza del material genético (ver trabajos de Hershey y Chase). De igual forma, el estudio del proceso de recombinación entre el genoma viral y el cromosoma bacteriano ha permitido comprender las reglas que rigen la recombinación en organismos superiores. Finalmente, debido a que ciertos bacteriófagos pueden portar ADN bacteriano como parte de su genoma y transmitirlo así a otras bacterias (proceso de transducción), estos

microorganismos son de gran ayuda en la investigación relacionada con la transferencia horizontal de genes. A pesar de que aún se discute si son ó no seres vivos, se ha determinado que están compuestos por un genoma (ADN ó ARN) que está empaquetado en una cápsula protéica llamada cabeza ó cápside. Los bacteriófagos, así llamados porque infectan bacterias, pueden interactuar con determinados receptores de la membrana bacteriana, introducir su genoma en el citoplasma bacteriano e iniciar así su multiplicación, fenómeno que culmina con la lisis de la bacteria infectada y la liberación de cientos de partículas virales (viriones) capaces de infectar a las células vecinas.



Figuras 2 y 3: Microfotografía electrónica de una bacteria infectada por fagos y esquema de la estructura de un bacteriófago.

OBJETIVO GENERAL

En el transcurso de éstos períodos se estudiarán las técnicas de manipulación, cultivo, multiplicación y caracterización de diferentes cepas de la especie *E. coli* serotipo K-12. Se trata de una cepa inocua en bajas concentraciones para los seres humanos. Por otra parte conoceremos las características de la multiplicación de los bacteriófagos, comúnmente llamados fagos: el fago λ (lambda) y el fago P1 ($\Phi\lambda$ y ΦP1).

PRIMERA PARTE

EQUIPO, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las bacterias y los bacteriófagos requieren de un medio de cultivo adecuado que les brinde las condiciones necesarias para su crecimiento y multiplicación, así como para expresar determinadas características fenotípicas. Es por ello que los investigadores han desarrollado diversas formas de almacenar, cultivar y caracterizar a los microorganismos. A continuación se describirán las técnicas básicas utilizadas con mayor frecuencia por los investigadores para tales fines. Su empleo se ha popularizado debido al control estricto que permiten tener sobre los microorganismos, la facilidad de manipulación de los instrumentos utilizados y las posibilidades de cultivo y almacenaje.

1. EQUIPO A UTILIZAR

Existe en el laboratorio una serie de instrumentos que facilitan la preparación y el trabajo con los medios de cultivo. Un primer grupo incluye a los materiales de vidrio (resistentes o no al calor); otro grupo más pequeño es aquel de los implementos de plástico y finalmente tenemos a los utensilios metálicos. Algunos instrumentos permiten medir el volumen de soluciones acuosas (que contengan o no microorganismos); otros permiten manipular muestras de pequeño volumen con el fin de transferir células de un recipiente a otro, o bien coleccionar muestras durante el crecimiento de los microorganismos para luego ser analizadas. Un último grupo incluye los aparatos que permiten concentrar, preservar, agitar, esterilizar o incubar los cultivos de microorganismos. (Fig. 4)

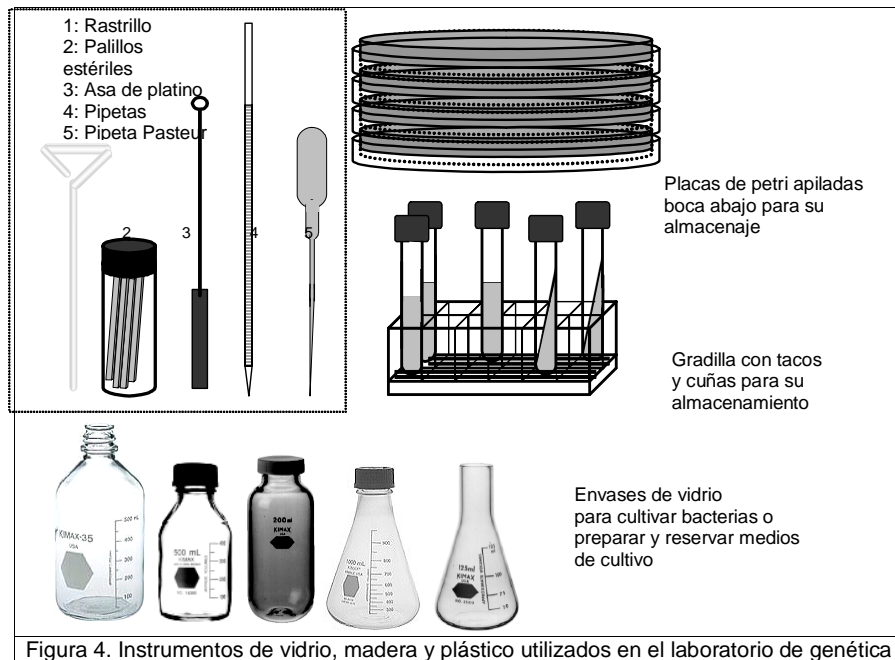


Figura 4. Instrumentos de vidrio, madera y plástico utilizados en el laboratorio de genética

El primer grupo de materiales de vidrio incluye a las fiolas que son utilizadas para preparar medios o cultivar en medio líquido; los fajardines son fiolas con una extensión de su base en forma de tubo que pueden ser utilizados para realizar mediciones espectrofotométricas de un cultivo sin necesidad de destaparlos. Los vasos de precipitado, también llamados *beakers*, no son muy utilizados porque su boca ancha los hace muy propensos a contaminación. En su defecto se pueden emplear envases de compota, dentro de los cuales se descartan sobrenadantes de cultivo o puntas de micropipetas,

Los tubos de ensayo con tapa, permiten el cultivo de pequeños volúmenes de suspensiones de microorganismos (hasta 25ml): pueden ser delgados para ser introducidos en el espectrofotómetro o también gruesos (utilizados para centrifugar). En algunos casos se usan tubos de plástico graduados (tubos Falcon), ideales para conservar cantidades precisas de soluciones y medios de cultivo. Los microtubos *Eppendorf* son muy utilizados: se trata de pequeños tubos de plástico (autoclavable) con los que se pueden realizar experimentos en pequeño volumen, ya que pueden contener hasta 2ml de solución. Los *Eppendorf* fueron creados por la necesidad de trabajar a pequeña escala y para mejorar el rendimiento experimental, junto con las micropipetas y las microcentrífugas.

Las cápsulas de Petri, fueron diseñadas para contener medios de cultivo agarizados (sólidos) sobre los cuales se inoculan ó siembran las bacterias. Para ello se puede utilizar un asa de platino o un rastrillo de vidrio. A veces se inocula la superficie del medio agarizado con otro tipo de agar, en el cual han sido suspendidas bacterias y/ó fagos. Hay que destacar al asa de platino, la cual permite transferir células de medio sólido a medio sólido ó líquido; para transferir células de una placa a otra (repicar) también se pueden utilizar palillos de madera que hayan sido previamente esterilizados. El último instrumento considerado en éste grupo es la pipeta pasteur plástica (ó de vidrio), la cual es una perilla que permite recoger, mezclar y resuspender las soluciones.

Entre los instrumentos de medida se encuentran las pipetas de vidrio –generalmente almacenadas y esterilizadas en pipeteros de metal- las micropipetas, los cilindros graduados y los balones aforados. Las pipetas de vidrio están diseñadas para medir desde 0.001 ml hasta 10 ml, se fabrican en diferentes presentaciones y apreciaciones de medida (10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01 ml). Para medidas inferiores a los 0,05 ml se recomienda la utilización micropipetas, las cuales poseen un mecanismo de mucha precisión que permite trabajar con volúmenes entre 0.1µl hasta 5000 µl. Las micropipetas de igual manera vienen en distintas presentaciones y apreciaciones las cuales se indican en microlitros (5000, 1000, 200, 100, 50, 10, 2 µl) (**Fig. 5**). Su costo es extremadamente alto!

El otro par de instrumentos de este grupo son el termómetro, tanto de pared como de inmersión para regular la temperatura las cuales son sometidas los cultivos en los diferentes experimentos, y el espectrofotómetro, un instrumento óptico que nos permitirá observar de manera rápida como se va desarrollando el crecimiento de un cultivo bacteriano, a través de la determinación de su densidad óptica.

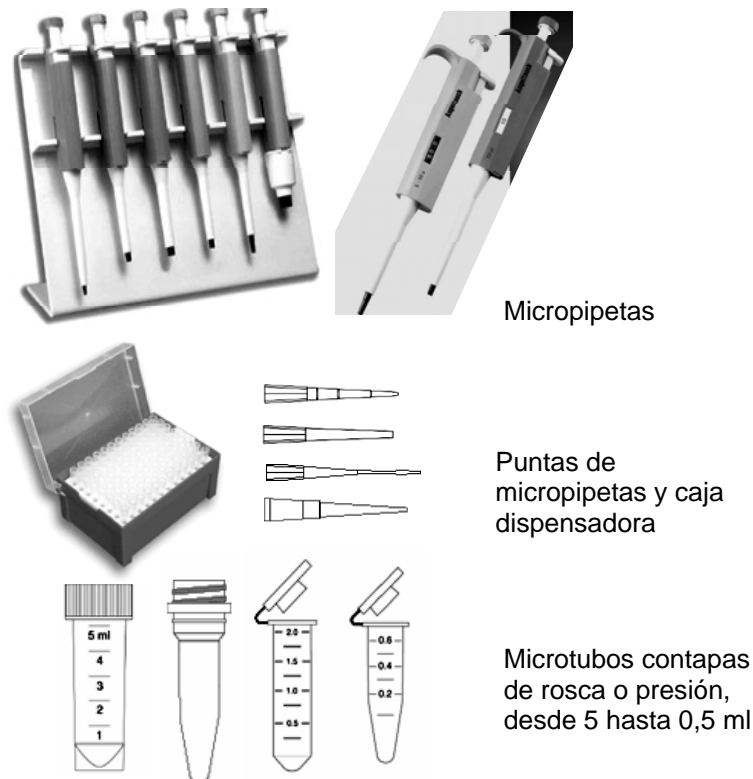


Figura 5. Instrumentos utilizados para realizar experimentos con pequeños volúmenes.

Para finalizar, en el laboratorio de genética se encuentran una serie de aparatos de gran tamaño y costo que facilitan el trabajo con bacterias y fagos. La centrifuga de tubos permite alcanzar altas velocidades de rotación, importante a la hora de sedimentar bacterias. Los tubos a centrifugar, colocados dentro de sus respectivas camisas de acero inoxidable, deben ser equilibrados previamente en una balanza de mesa, para evitar daños a la centrífuga. También existe la micro-centrifuga para los microtubos: la misma permite alcanzar velocidades de centrifugación muy elevadas. El agitador eléctrico o *vortex* permite mezclar o resuspender soluciones en tubos de diferentes tamaños. Para el almacenamiento por largos períodos de tiempo de las soluciones (divididas en *stocks* de alta concentración para diluirse posteriormente) es necesario tener un congelador cuya temperatura se mantenga alrededor de los -20°C ; por otra parte para disminuir la actividad metabólica de un determinado cultivo y prolongar su utilización, o bien para mantener fría una solución, es necesario un refrigerador o nevera común cuya temperatura se mantenga alrededor de 4°C . Por último para suplir las condiciones externas óptimas necesarias de un cultivo bacteriano es imprescindible disponer en el laboratorio de un cuarto estufa o cámara de incubación, el cual mantiene una temperatura entre 30 y 37°C . Esta pequeña habitación puede tener en su interior un agitador mecánico, que permite agitar diferentes recipientes de cultivo a velocidades predeterminadas.

Todos los instrumentos anteriormente mencionados, así como los componentes que serán utilizados en la preparación de medios de cultivo, deben someterse a un proceso de **ESTERILIZACIÓN**, con el fin de eliminar cualquier contaminante antes de iniciar los experimentos. Para ello se utilizan el autoclave y la estufa (esterilización húmeda y seca, respectivamente). En el autoclave son introducidas las fiolas con sus tapones de algodón y gasa, los tubos con tapa dispuestos en gradillas, grupos de placas de Petri envueltas en papel, y los diferentes componentes separados en alícuotas dependiendo de su uso. El autoclave somete a estos instrumentos a altas presiones y temperaturas, destruyendo así cualquier microorganismo que podría contaminar posteriormente las soluciones y los medios, alterando así los resultados en los experimentos. Las pipetas son esterilizadas a altas temperaturas en la estufa, dentro de los pipeteros metálicos. En el caso del asa de platino, esta se calienta directamente sobre la llama del mechero hasta ponerse roja incandescente y luego se enfría en el aire (y en los bordes del medio agarizado) para evitar quemar las células que serán colectadas. Para la esterilización del rastrillo de vidrio, éste se sumerge en alcohol y luego se flamea, procurando apagar el fuego pronto sacudiéndolo cerca del mechero; de esta manera queda estéril para esparcir células en la superficie del medio agarizado.

NORMAS GENERALES DE LABORATORIO

Siguiendo los procedimientos anteriormente descritos se garantiza la **asepsia** en el laboratorio de genética, condición **FUNDAMENTAL** para la realización de experimentos. Además de estas precauciones es **OBLIGATORIO** lo siguiente: limpiar el mesón de trabajo con cloro dispuesto por el laboratorio; trabajar cerca de la llama del mechero, lo que proporciona un área libre de microorganismos donde se podrán destapar los tubos, fiolas y pipeteros para realizar el trabajo experimental. Esta superficie queda restringida a las cercanías del mechero ($\approx 30\text{cm}$); también se debe evitar hablar o toser durante el trabajo y en las cercanías del mechero, así como evitar los flujos de aire o viento en el laboratorio que modifiquen el ambiente estéril que se ha creado. De igual manera debe utilizarse la bata cerrada para evitar entrar en contacto directo con microorganismos así como proteger la ropa del cloro. Por último, las personas que tengan el cabello largo deben recogerlo para evitar que se queme accidentalmente en el mechero o caiga cabello sobre los medios.

La utilización apropiada de los implementos anteriormente descritos, así como el cumplimiento de las instrucciones para la esterilización y asepsia son indispensables para la obtención de

resultados coherentes y significativos a través de las técnicas que se describirán a lo largo de los distintos períodos de prácticas.

2. LOS MEDIOS DE CULTIVO

Las bacterias pueden ser cultivadas en diferentes medios (sólidos y líquidos) los cuales varían en su composición dependiendo de los experimentos que se vayan a realizar .

Aquellos medios que suministran los requerimientos nutricionales de una determinada especie (ó cepa) bacteriana mediante la incorporación de sustancias complejas como la proteína de la leche (caseína), el extracto de carne o el extracto de levadura, sin una definición exacta de su composición, son denominados **medios ricos**. En estos medios puede crecer cualquier tipo de microorganismo, independientemente de sus requerimientos particulares, por lo que hay que ser muy estricto con la asepsia.

Los medios cuya composición y concentración de nutrientes sean conocidas y perfectamente definidas, son denominados **medios mínimos ó sintéticos**. Por ejemplo, ciertos medios de uso corriente poseen una fuente de carbono sencilla (glucosa, lactosa, manosa, galactosa, entre otras), una fuente de nitrógeno (cloruro de amonio o sulfato de amonio), una mezcla de sales inorgánicas (Mg^{++} , PO^{-4} y SO^{-4}), además de aminoácidos, purinas o pirimidinas, y vitaminas.

Otra clasificación de los medios de cultivo está relacionada con la capacidad de las bacterias para crecer en los mismos. Se llaman **medios diferenciales** aquellos medios ricos a los cuales se les agrega un compuesto que permite poner en evidencia diferencias (fenotípicas) entre especie/cepas bacterianas en la misma placa: por ejemplo, diferencias en el metabolismo de azúcares. Otro tipo de medio son los **medios selectivos** los cuales permiten únicamente el crecimiento de la especie/cepa que se desea aislar en función de alguna característica (fenotípica) particular que no presentan otras cepas (ó especies). Para ello pueden utilizarse medios ricos suplementados con antibióticos o compuestos tóxicos tales como los metales pesados. También pueden emplearse medios mínimos con composiciones particulares.

En muchos casos es conveniente cultivar las bacterias en medios sólidos, también llamados agarizados. Estos medios se obtienen agregando agar a los medios líquidos –ya sean ricos ó mínimos- para obtener medios agarizados duros (1-2% de agar) ó blandos (0.7% de agar). Todos estos medios deben alicuotados en pequeños volúmenes, luego de ser preparados, para su correcta esterilización. Al momento de ser utilizados para preparar las placas de Petri deben calentarse hasta llegar al estado líquido (50°C aproximadamente) en un baño María ó un horno microondas.

Los medios sólidos duros vertidos en placas de Petri son utilizados para cultivar, caracterizar y cuantificar bacterias; si el medio agarizado se introduce en un tubo y se deja enfriar en posición inclinada se forma una **cuña**, la cual provee de una superficie útil para la siembra de bacterias y su almacenamiento por corto tiempo.

Los medios sólidos blandos también pueden ser vertidos en el interior de tubos de vidrio los cuales se dejan enfriar parados, formando así un **taco**. En estos tacos permiten la preservación de bacterias por períodos de tiempo más largos.

3. CONDICIONES DE CULTIVO

Una población microbiana en crecimiento activo, en un medio nutritivo, constituye un **cultivo**. Las bacterias crecen con mayor rapidez (= menor tiempo de generación) en medio rico que en medio mínimo, ya que en éstos últimos las células deben adaptar toda su maquinaria

metabólica para sintetizar los compuestos que no son aportados por este medio (por ejemplo aminoácidos, purinas y pirimidinas). Sin embargo, los medios mínimos son muy útiles para el aislamiento y la caracterización de las bacterias.

La composición del medio de cultivo no es el único factor determinante para el crecimiento de las bacterias: existen además factores externos e internos que afectan el crecimiento de un cultivo, entre los cuales se pueden mencionar la temperatura, la presión atmosférica, la oxigenación del medio y la agitación (como factores externos), así como el pH del medio y la concentración de sales (como factores internos). Modulando estos factores se puede retardar o acelerar el crecimiento bacteriano.

Aunque un medio puede ser adecuado para el crecimiento inicial de una bacteria, el desarrollo subsiguiente de la población bacteriana puede verse limitado severamente debido a los cambios químicos producto del propio crecimiento y metabolismo de los microorganismos. Por ejemplo, en los medios glucosados se pueden producir ácidos orgánicos como resultado de la fermentación microbiana, ácidos que son capaces de inhibir el crecimiento. Por otro lado, la descomposición de las proteínas y los aminoácidos pueden alcalinizar el medio como consecuencia de la producción de amoníaco.

Los fosfatos son ampliamente utilizados en la preparación de los medios de cultivo ya que son compuestos inorgánicos que amortiguan los cambios en la acidez del medio (pH) resultante del crecimiento, además de ser relativamente inocuos para las bacterias, cuando son utilizadas en concentraciones menores de 5g/l. Los fosfatos constituyen además una fuente de fósforo inorgánico.

La temperatura a la cual las bacterias manifiestan su crecimiento óptimo refleja generalmente las condiciones de su hábitat natural. Por ejemplo, la temperatura óptima para el crecimiento de *Escherichia coli* y otras bacterias que colonizan diferentes órganos en animales de sangre caliente es de aproximadamente 37°C, por lo que los cultivos de estas especies suelen realizarse a esa temperatura. En el caso de bacterias crecidas en medio rico, se puede controlar el crecimiento bajando la temperatura a 30°C, bien sea en una estufa o en un baño María a temperatura constante.

Con respecto al oxígeno, se trata un elemento que representa un requerimiento esencial para el cultivo de bacterias aeróbicas obligadas, y un veneno para las anaeróbicas estrictas. En el caso de *E. coli* no existe mayor inconveniente con el suministro de oxígeno ya que es una bacteria anaeróbica facultativa, es decir, puede crecer tanto en presencia de oxígeno como en su ausencia, aunque en este último caso la velocidad de crecimiento disminuye con respecto al crecimiento aeróbico.

Las bacterias aeróbicas crecen fácilmente sobre la superficie de los medios agarizados, formando colonias de aspecto y color característicos. Para obtener grandes poblaciones en medio líquido se recomienda airear el cultivo mediante una agitación fuerte (usando un agitador orbital, por ejemplo). También se puede utilizar un filtro poroso a través del cual se pueden inyectar finas burbujas de aire para así facilitar el contacto entre el líquido y el aire.

Para cultivar bacterias anaeróbicas estrictas se pueden utilizar frascos herméticamente cerrados, provistos de tapones de vidrio esmerilado que se llenan hasta el tope con el medio, que ha sido previamente desoxigenado por ebullición. El cultivo de estas bacterias en medio sólido se logra sembrando en el interior de medios agarizados desoxigenados o en la superficie de placas de agar, las cuales son colocadas en recipientes que luego pueden ser vaciados y llenados con nitrógeno o hidrógeno puro, o inclusive una mezcla de ellos con CO₂.

Ciertos compuestos que facilitan el cultivo de bacterias anaeróbicas son el tioglicolato sódico (1gr/l), la cisteína ó el sulfuro sódico (0,1g/l): hirviendo o esterilizando un medio que contiene alguno de estos compuestos se pueden conseguir condiciones fuertemente reductoras. Es conveniente añadir a estos medios pequeñas cantidades de agar (0,5 – 2%) para aumentar su viscosidad, facilitando así el mantenimiento de la anaerobiosis.

Cuando las bacterias son sembradas en cajas de Petri conteniendo medio agarizado (bajo condiciones que permitan su desarrollo) cada célula bacteriana depositada en la superficie del agar crece y se divide innumerables veces, originando por lo tanto un clon a partir de un solo individuo. La colonia de bacterias descendientes es por lo tanto genéticamente homogénea. Horas después que esta célula fue depositada en el agar, la colonia puede observarse a simple vista.

Cuando las bacterias son sembradas en medio líquido (bajo condiciones que permiten su desarrollo) y después de varias horas de incubación, el medio comienza a opacarse una vez que la densidad celular alcanza las 10^7 bact/ml. El máximo número de células que se puede alcanzar en un medio de cultivo es de alrededor de 10^9 bact/ml; esto se debe principalmente a que los nutrientes colocados en el medio se agotan a medida que aumenta la cantidad de células, al tiempo que se acumulan los productos metabólicos que pueden ser tóxicos.

SEGUNDA PARTE

METODOS GENERALES

1. **Siembra en medio líquido:** tomar con un asa de platino o con una pipeta un inóculo proveniente de una cuña o de un cultivo líquido, inocular un medio de cultivo líquido e incubar bajo las condiciones que permitan el mejor crecimiento de la cepa.

2. **Siembra en medio sólido:** consiste en sembrar células sobre cajas de Petri conteniendo medio agarizado

a) Siembra por extensión en superficie: consiste en esparcir de manera uniforme una gota (0,1ml generalmente) de un cultivo en la superficie de un medio sólido en placas de Petri, con un movimiento rápido, continuo y suave del rastrillo sobre la superficie y otro movimiento giratorio de la placa, hasta que ésta quede completamente seca.

b) Siembra utilizando agar blando: esto se logra mediante la mezcla de un cultivo de bacterias con una pequeña cantidad de agar blando, mantenido a 45°C para que el agar no solidifique y tampoco mate a las células. La mezcla es distribuida homogéneamente sobre la superficie de la caja de medio agarizado. Es necesario trabajar rápidamente para que el agar blando no solidifique antes de terminar la manipulación.

3. **Método de diluciones seriadas:** la dilución de un cultivo es necesaria para obtener un número de colonias fácil de contar (menos de 200 colonias por cápsula de Petri). El método de dilución seriada consiste en pasar pequeños volúmenes de una suspensión bacteriana de un tubo al tubo siguiente y así sucesivamente cuantas veces sea necesario (ver **Fig. 6**).

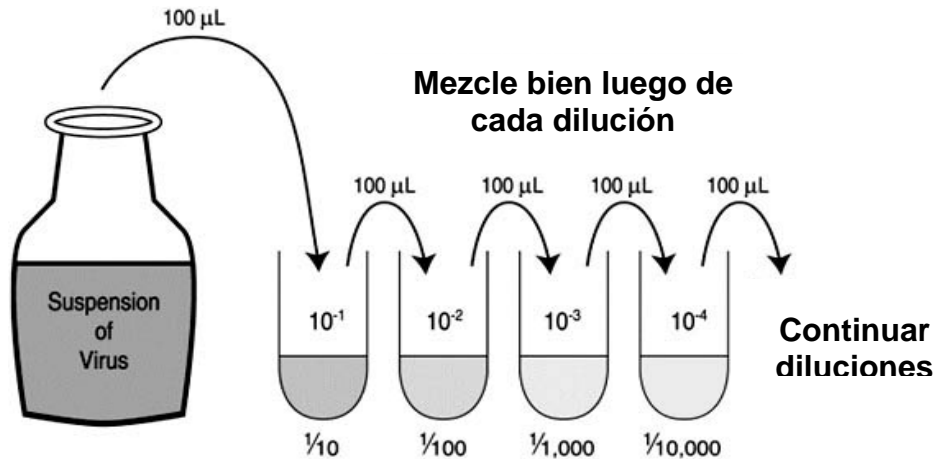


Figura 6: Esquema de dilución seriada de un cultivo.

Esto se hace disponiendo de varios tubos conteniendo un volumen fijo de medio líquido (o de sales) 0,9ml por ejemplo y se agregan 0,1ml del cultivo original: esto es una dilución 1 en 10 (o sea 10^{-1}). Luego, se toman 0.1 ml de este tubo y se pasan al tubo 2 que también contiene 0,9ml de medio (dilución $1/100$ ó 10^{-2}): de esa manera el tubo 1 tendrá 10 veces menos células que el cultivo original, y el tubo 2 tendrá 10 veces menos células que el tubo 1, y así sucesivamente. Con esto se logra diluir un cultivo bacteriano para ser titulado tantas veces como sea necesario.

4. Aislamiento de cepas bacterianas: como paso previo al inicio de cualquier investigación, es estrictamente necesario aislar las cepas bacterianas con las cuales se trabajará, siendo absolutamente necesario que la población provenga de un solo clon, es decir, que sea genéticamente homogénea. Los procedimientos de aislamiento en medio sólido son los más prácticos ya que se logra inmovilizar a las bacterias, separándolas unas de otras, permitiendo así el desarrollo de colonias de origen unicelular. En general las bacterias deben sembrarse inicialmente en medio rico agarizado por dos razones: para minimizar las presiones selectivas que pueden favorecer la aparición de mutantes espontáneos y para permitir que cualquier contaminante crezca y así poderlo detectar. Para el aislamiento de colonias se utilizan dos métodos que serán descritos a continuación:

a) Aislamiento por dilución: consiste en hacer diluciones seriadas del cultivo en agar blando, para luego verterlo sobre placas de Petri conteniendo agar duro.

b) Aislamiento por agotamiento: con el asa se toma una pequeña cantidad de células provenientes de un taco, una cuña o inclusive una colonia, y con movimientos suaves evitando rasgar la superficie del agar se depositan las células sobre la superficie del mismo, realizando trazos cortos y sucesivas esterilizaciones del asa para lograr el agotamiento (ver **Fig.7**).

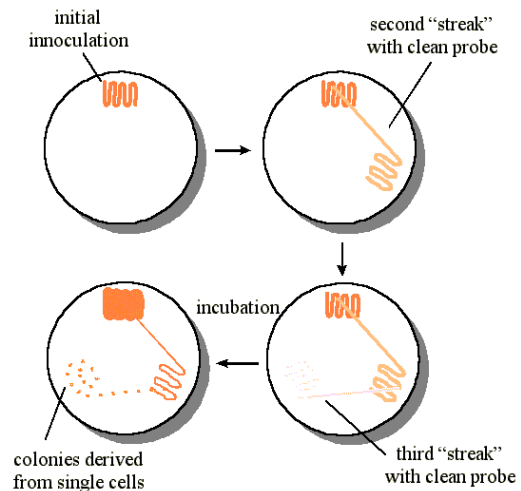


Figura 7: Aislamiento por agotamiento con asa.

TERCERA PARTE

MÉTODOS AVANZADOS MANIPULACIÓN DE BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS

1. CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

El genotipo de una cepa bacteriana, hablando en términos estrictamente genéticos, se refiere a la serie de determinantes genéticos que han sido identificados en esa cepa en particular y que constituyen su “carnet de identidad”. En este sentido, el genotipo de una cepa sólo contempla aquellos genes cuyas mutaciones han sido evidenciadas experimentalmente. Generalmente se usan abreviaciones de tres letras minúsculas para describir diferentes *loci* genéticos, por ejemplo *lac* para lactosa, *met* para metionina, *his* para histidina. Estos símbolos son seguidos por letras mayúsculas para distinguir *loci* ó genes relacionados, por ejemplo: *metA*, *metB*, *lacZ*, *lacY*; se utilizan números para identificar las diferentes mutaciones de cada locus: *metA2*, *lacZ82*, y así sucesivamente. Otro tipo de descripción genotípica es aquella que utiliza el signo (+) para describir el alelo salvaje. Así *metA*⁺ indica el alelo salvaje del locus *metA*. No obstante, cuando se hace una lista del genotipo de una cepa, sólo son reportados aquellos alelos que difieren del salvaje (alelos mutantes). Algunos autores utilizan el signo (-) para designar los alelos mutantes como *trp*⁻ (triptófano) ó *his*⁻ (histidina).

El fenotipo, por el contrario, es el conjunto de propiedades que pueden ser puestas en evidencia a través de diferentes métodos: observación visual, métodos bioquímicos, moleculares, etc. Con respecto a las características fenotípicas, estas son reportadas con símbolos de tres letras comenzando con una letra mayúscula. Por ejemplo Lac⁻ indica la incapacidad de la bacteria para metabolizar la lactosa, Met⁻ indicará que la bacteria no puede sintetizar el aminoácido metionina y que por lo tanto no crecerá en medios sin metionina; por último Str^r indicará que la bacteria es resistente al antibiótico estreptomicina mientras que Str^s identifica a una cepa sensible.

Una vez que se ha logrado la purificación de una cepa bacteriana, es necesario determinar (ó confirmar) su genotipo -de manera indirecta- mediante la puesta en evidencia de determinadas características fenotípicas, para asegurar así la pureza de la cepa (y evitar conservar junto a esta algún contaminante o mutante indeseable). En estos procedimientos de caracterización fenotípica, al igual que en los de aislamiento, los medios de cultivo agarizados son de mayor utilidad que los medios líquidos.

Las cepas bacterianas pueden ser caracterizadas por su capacidad para fermentar (o no) determinados azúcares, sintetizar (o no) diferentes aminoácidos, y ser resistentes o sensibles a determinados antibióticos, entre otras propiedades.

Las especies bacterianas difieren mucho respecto al tipo de compuestos químicos que pueden utilizar como fuente de carbono para su metabolismo. Existen cepas bacterianas que son capaces de crecer en un medio constituido únicamente por sales minerales y un azúcar (como fuente de carbono), ya que poseen las enzimas que les permiten sintetizar compuestos complejos -como los aminoácidos- a partir de sustancias sencillas. A este tipo de bacterias se les denomina **PROTOTROFICAS** Por otra parte, aquellas bacterias que dependen del medio para obtener los compuestos que no pueden biosintetizar por si solas son denominadas bacterias **AUXOTRÓFICAS** y las mismas solo pueden crecer en medios suplementados con el (o los) compuesto(s) que requieran, además del azúcar y las sales minerales.

La capacidad de fermentar un determinado azúcar puede ser evaluada de dos formas: i) utilizando medios mínimos conteniendo cada uno de los azúcares de interés y observando el crecimiento bacteriano (ó su ausencia), y ii) sembrando las bacterias en medios diferenciales - como el medio DOCLac- que permitirá diferenciar aquellas colonias que metabolizan el azúcar añadido en base a la aparición de un color.

Para los estudios bioquímicos y genéticos, se utilizan preferentemente cepas mutantes auxotróficas, ya que las exigencias nutritivas constituyen una característica de fácil detección fenotípica. Además, las auxotrofías permiten purificar una determinada cepa bacteriana, en caso de haber sido contaminada con otros microorganismos.

Para determinar la susceptibilidad de una cepa a un antibiótico, se siembra la bacteria que se desea estudiar en un medio rico conteniendo una concentración adecuada del antibiótico: si la bacteria no crece se dice que es sensible; en caso contrario la bacteria es denominada resistente para ese antibiótico. Es necesario tomar en cuenta la necesidad de incluir controles adecuados (positivos y negativos) en cada uno de estos experimentos, para no cometer errores de identificación.

2. TITULACIÓN DE UN CULTIVO BACTERIANO

El número de bacterias presentes en un volumen determinado de cultivo es lo que se denomina el **título bacteriano** (ó densidad bacteriana). Varios métodos pueden ser utilizados para determinar el título de un cultivo. Describiremos a continuación los dos más utilizados en el laboratorio.

El método del recuento viable se basa en tomar pequeñas alícuotas de un cultivo de bacterias, diluirlas y rastrillarlas sobre cápsulas de Petri conteniendo medio rico para observar -después de varias horas- el número de unidades formadoras de colonias (UFC), es decir, el número de bacterias vivas a partir de las cuales se formarán colonias (las bacterias muertas no formarán colonias!). Este sistema de titulación es muy útil ya que cuantifica únicamente las bacterias vivas, pero sus desventajas son el tiempo que tarda en obtenerse la información y lo trabajoso de la técnica.

Por otra parte, el método de la cuantificación de la turbidez se basa en realizar mediciones espectrofotométricas de muestras de cultivo y compararlas con una curva patrón, obtenida de antemano. En esta curva de calibración se relaciona la densidad bacteriana (bact/ml), determinada por recuento viable, con la densidad óptica (DO). De esa manera se puede saber el número de células en un cultivo midiendo su DO.

3. MULTIPLICACIÓN DE BACTERIOFAGOS

Las suspensiones de fagos (= lisados) se obtienen infectando un cultivo de una bacteria sensible a esa estirpe particular de fago y permitiendo un crecimiento adicional, para que haya una multiplicación de los fagos y una subsiguiente lisis de las bacterias.

La multiplicación puede llevarse a cabo en medio líquido o en medio sólido según el tipo de fago. En el caso de medios líquidos se mezclan una suspensión de fagos, con una cantidad fija y previamente determinada de bacterias, de manera que se obtenga una relación fago:bacterias de 1:1000. Esta mezcla se incuba por 5 horas aproximadamente a 37°C con agitación suave para permitir la multiplicación de los fagos. No es conveniente incubar por más tiempo ya que los fagos liberados durante la lisis celular pueden reabsorberse a fragmentos de bacterias lisadas, lo cual provoca la disminución del título final de bacteriófagos. Luego se agrega cloroformo para lisar por completo las células, se centrifuga y el sobrenadante que contiene los fagos es recolectado y mantenido en frío.

El método de titulación de fagos (virulentos ó líticos) en medio sólido consiste en sembrar agar blando conteniendo la mezcla de adsorción (fagos:células) sobre cajas de medio agarizado. Las bacterias crecerán formando un “césped” lechoso, sobre el cual se destaca la aparición de pequeñas zonas de lisis (calvas), correspondiente a aquellas células que han sido infectadas y lisadas en ciclos sucesivos por un solo virión y sus descendientes. Si la cantidad original de fagos es elevada, alrededor de 10^5 fagos/caja, se observará una lisis confluyente sobre la superficie del agar (es decir: la formación de calvas de lisis en toda la superficie del césped bacteriano). Después de 8 horas de incubación, los fagos son recolectados, centrifugados y mantenidos en frío.

En el caso de los fagos lisógenos (fagos cuyo genoma puede incorporarse al cromosoma de la bacteria hospedadora), la forma más efectiva de preparar lisados es induciendo el cultivo de la cepa lisógena (mediante la irradiación con luz UV, por ejemplo). Esto “activa” el proceso de multiplicación de los fagos y la posterior lisis de la célula hospedadora.

Estos procedimientos, así como la composición de los medios de cultivo necesarios para llevarlos a cabo, pueden variar dependiendo del tipo de fago que se desea multiplicar o titular.

4. TITULACIÓN DE UN STOCK DE BACTERIOFAGOS

Al igual que en el caso de los cultivos bacterianos, el número de partículas virales (viriones) presentes en un lisado por unidad de volumen es lo que se denomina “Título”.

El método más sencillo para determinar el título de un lisado es el recuento de placas de lisis. Este valor puede determinarse mezclando -en agar blando- un volumen de un cultivo fresco de bacterias sensibles con 0.1 ml de una dilución conocida de un lisado y esparciendo esta mezcla sobre la superficie de un medio agarizado. Después de varias horas de incubación la superficie del medio presentará una capa continua de crecimiento bacteriano, lo que es conocido como un césped de bacterias, excepto en aquellos puntos donde ha sido depositada una partícula de fago o una célula infectada por un fago. En torno a tales puntos aparecerán zonas de lisis o placas (“calvas”), como resultado de la destrucción localizada (lisis) de la película de bacterias, a lo largo de ciclos sucesivos de infección/multiplicación/lisis.

Puesto que cada partícula de fago que infectó una bacteria original produce una sola placa de lisis, sólo es necesario contar el número de calvas que aparecen sobre el agar después de la incubación. Para calcular la concentración o título de un “stock” de fagos se multiplica el número de calvas de lisis por el factor de dilución respectivo, y luego se divide entre el volumen del lisado utilizado en la mezcla de adsorción. El cálculo a realizar es igual al utilizado para calcular el título de bacterias: en este caso se cuentan placas de lisis en vez de unidades formadoras de colonia.

Este procedimiento puede variar un poco dependiendo del tipo de fago con el que se esté trabajando, al igual que la composición del medio agarizado. Con el fin de obtener mejores resultados, es recomendable sembrar la mezcla de infección sobre cajas aún húmedas, preparadas el mismo día.

5. MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

a) Cepas bacterianas:

Una vez que una cepa ha sido aislada y purificada es necesario mantenerla en un medio que asegure su máxima supervivencia durante períodos de tiempo prolongados. Estas cepas deben ser transferidas con cierta periodicidad a medios frescos (repicadas), con el fin de prevenir su muerte por acumulación de sustancias tóxicas, falta de nutrientes y/o deshidratación. Este proceso debe realizarse bajo condiciones rigurosamente estériles para evitar la contaminación con otro tipo de organismos. Periódicamente debe también verificarse el genotipo de las cepas conservadas a través de pruebas de caracterización fenotípica, así como realizar enriquecimientos o reaislamientos según sea necesario.

A fin de disminuir la actividad metabólica de los cultivos de colección y aumentar la longevidad de los mismos, las cepas purificadas deben ser sembradas en cuñas y tacos y ser mantenidas preferiblemente a bajas temperaturas (4°C) como se indicó en la primera parte de esta guía. Las bacterias sembradas en tacos pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo (meses), mientras que las cuñas son recomendables para proveer bacterias frescas para inocular medios de cultivo sólidos o líquidos.

Sin embargo, la mejor forma de preservar las cepas bacterianas es a través de la liofilización: esta técnica consiste en deshidratar completamente las células a muy bajas temperaturas, sin que la viabilidad celular sea afectada, en un aparato llamado liofilizador. Esto permite su almacenamiento por decenas de años sin que exista el peligro de cambios a nivel del genoma de la cepa liofilizada. Cuando una de estas cepas es requerida, el liofilizado es rehidratado y reactivado en medio líquido.

b. Cepas (ó estirpes) de fagos

Las cepas de fagos se conservan en suspensiones líquidas a bajas temperaturas (4°C) en presencia de cloroformo. Los lisados deben ser multiplicados periódicamente sobre cepas sensibles, para mantener un título alto (10^{10} a 10^{11} fagos/ml). Antes de realizar cualquier experiencia es necesario verificar el título de los lisados.

PERIODOS EXPERIMENTALES: PRACTICAS 1 a 4

OBJETIVOS

Adiestrar al estudiante en la correcta manipulación de los instrumentos utilizados en un laboratorio de genética
Dar a conocer y preparar los diferentes medios de cultivo y los métodos más utilizados para manipular bacterias y bacteriófagos.
Ejercitar al estudiante en la manipulación de bacterias y bacteriófagos bajo condiciones asépticas.

1er Período: Preparación de medios de cultivo para bacterias y bacteriófagos. Aprendizaje de métodos generales de microbiología.

1. Medios de cultivo. Lea atentamente la composición de cada medio que figura en los anexos de esta guía. Observe con atención el procedimiento utilizado por sus preparadores para la preparación de los diferentes tipos de medio de cultivo: agarizados y líquidos; ricos y mínimos; selectivos y diferenciales. Una vez esterilizados los medios (o los componentes individuales, según sea el caso) mezcle los diferentes componentes en condiciones asépticas y vierta en placas de Petri estériles. Espere que se enfríen en posición horizontal (tapa hacia arriba) e incube por 24 h (tapa hacia abajo) a 37°C, para comprobar esterilidad. Conserve luego en nevera hasta por dos semanas.

2. Inoculación para conservación de cepas bacterianas. Con el uso de un asa de metal inocule tacos y cuñas a partir de cultivos líquidos y/o colonias aisladas crecidas en medio agarizado. Los tubos serán colocados en gradillas e incubados en el cuarto estufa a 37°C durante 24 horas. Luego de este período, los tacos y cuñas serán conservados en la nevera para su observación en el siguiente período de práctica y posterior conservación.

3. Aislamiento de colonias. A partir de cultivos de diferentes cepas, intente aislar colonias individuales sobre una caja de Petri mediante el método de aislamiento por agotamiento. Una vez inoculada, coloque la placa con la base hacia arriba e incube a 37°C por 24 horas. Recuerde utilizar una sola caja de medio rico por cada cepa.

2o Período: Caracterización fenotípica de cepas bacterianas.

Seleccione los marcadores fenotípicos que desee poner en evidencia para cada una de las cepas que se utilizarán a lo largo del Laboratorio de Genética I, y prepare las cajas de Petri con los medios agarizados correspondientes (selectivos, diferenciales, mínimos y/o ricos) (ver Anexos). Estas cajas deben reposar durante un día en el cuarto estufa hasta que pierdan el exceso de humedad, lo cual permitirá además comprobar su esterilidad; en ese momento estarán listas para ser sembradas. Para evidenciar el fenotipo de las distintas cepas, se utilizará el método de siembra con asa de platino y/o palillo estéril. Una vez incubadas por 24-48 h, cotejar los resultados obtenidos con los genotipos reportados en la Tabla anexa.

Nombre	Genotipo	Fenotipo	Plásmidos	Origen
303 (OEG 2)	<i>metB, λ</i>	Met ⁻ , Str ^S	Hfr	Wollman
322 (OEG 9)	B ₁ , <i>lacI</i>	Lac ⁺ const. Nal ^S , Str ^S	Hfr	Hayes
332 (OEG 11)	<i>thr, leu, B₁</i> ,	Str ^R , F ⁻ , Gal ⁺ , Lac ⁻ , Thr ⁻ , Leu ⁻	C600/Str, col+B, F ⁻	
356 (OEG 15)	<i>thr, leu, B₁, his, arg, pro, ade, lacY, galB, T1</i>	Str ^R , Gal ⁻ , Lac ⁻ , Thr ⁻ , Leu ⁻ , His ⁻ , Arg ⁻ , Pro ⁻ , Ade ⁻	F ⁻	Wollman
VE777	$\Delta(lac\ pro)$, <i>thi, nal, \Delta(his\ gnd)</i>	Lac ⁻ , Pro ⁻ , His ⁻ , B ₁ ⁻ , Nal ^R , Str ^S	F ⁻	
CSH36	F'(<i>lac proAB</i>)	Str ^S , Lac ⁺ , Pro ⁺	F ⁺	

3er Período: Titulación de un cultivo bacteriano y estudio del crecimiento bacteriano.

1. Realización de una curva patrón. A partir de un cultivo bacteriano fresco realice diluciones seriadas en medio L (SD, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Recuerde cambiar la pipeta en cada dilución. Mida en el espectrofotómetro la densidad óptica a 600nm obtenida para cada dilución, utilizando el mismo medio L como blanco. Anote los valores en la tabla anexa. Cada una de estas diluciones será utilizada además para titulación por recuento de viables (unidades formadoras de colonias, UFC). Para ello, siembre por rastrillado 0,1 ml de cada dilución (su preparador le indicará cuáles de ellas) en medio agarizado. Al día siguiente, cuente el número de colonias en cada placa. Si el número de colonias es muy grande, subdivida la placa en cuadrantes iguales, cuente las colonias (UFC) en uno de ellos y multiplique por el factor que corresponda. El título de la suspensión bacteriana se calculará según la fórmula

$$T \text{ (UFC/ml)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ UFC} \times \text{FD}}{\text{Vol siembra}}$$

Anote los valores obtenidos en la otra fila de la Tabla.

Diluciones seriadas	D.O. (600 nm) ML	UFC/ml ML	D.O. (600 nm) MM+glu	UFC/ml MM+glu
sin diluir (SD)				
1/2				
1/4				
1/8				
1/16				
1/32				

Repita este mismo procedimiento esta vez con células crecidas y diluídas con medio mínimo+glucosa. Anote y grafique sus resultados en papel milimetrado.

2. Titulación de un cultivo bacteriano. A partir de las mismas diluciones seriadas del cultivo anterior, realice nuevamente diluciones seriadas (las que le indique el preparador) y con la ayuda de un rastrillo, extienda de manera uniforme un volumen determinado de cada dilución sobre placas conteniendo medio rico sólido (MLD: Medio Luria Duro). Coloque en el cuarto estufa a 37°C durante 24 horas. Cuente las unidades formadoras de colonia (UFC) de cada placa y relaciónelas con el factor de dilución y el volumen de siembra de la siguiente manera:

	Diluciones seriadas del cultivo original					
	S/D	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Diluciones a sembrar						

3. Estudio del crecimiento bacteriano. A partir de sendos preinóculos crecidos toda la noche a 37°C, inocule las células de *E. coli* en el medio líquido correspondiente. Se utilizarán distintos tipo de medio para este experimento: medio rico (ML), y medio mínimo suplementado con glucosa ó lactosa. El preinóculo crecido en ML será inoculado **a)** en ML y **b)** en medio mínimo con glucosa. El preinóculo crecido en medio mínimo glucosa será inoculado en **a)** medio L, **b)** medio mínimo+glucosa y **c)** medio mínimo+lactosa. Los cultivos serán incubados a 37°C con ó sin agitación, y se medirá la DO a 600 nm de cada uno de ellos cada 30 min. Los valores serán reportados en una tabla y graficados **a)** en papel milimetrado y **b)** en papel semilog. Para tal efecto, los valores de DO serán transformados en valores de UFC/ml, utilizando para ello la curva patrón elaborada en el curso de esta práctica. En base a esta información calcule (gráficamente) el tiempo de generación de cada cultivo, siguiendo el procedimiento indicado por su profesor.

4o Período: Multiplicación y titulación de fagos virulentos.

A partir de un lisado de fagos virulentos (P1, λvir) que le será entregado por sus preparadores, realice diluciones seriadas en ML. Para ello agregue 0.1 ml del lisado a 0.9 ml de ML y así sucesivamente. De cada una de las diluciones que le indicará su preparador, tome 0,1 ml y mézclelo con 0,2 ml de un cultivo bacteriano. Incube por 20 min a 37°C. Agregue a cada tubo 2,5 ml de MLB (blando), agite suavemente y vierta sobre la superficie de una placa conteniendo medio MLD (duro). Esparza bien sobre la superficie y deje reposar. Incube a 37°C por 24 h.

Al día siguiente observe la formación de placas de lisis sobre el césped bacteriano. Note la diferencia entre el fenotipo de las placas de ambos fagos. A partir de aquellas placas de Petri que contengan un número adecuado de placas de lisis, cuente el número total de éstas. Calcule el título original del lisado según la fórmula:

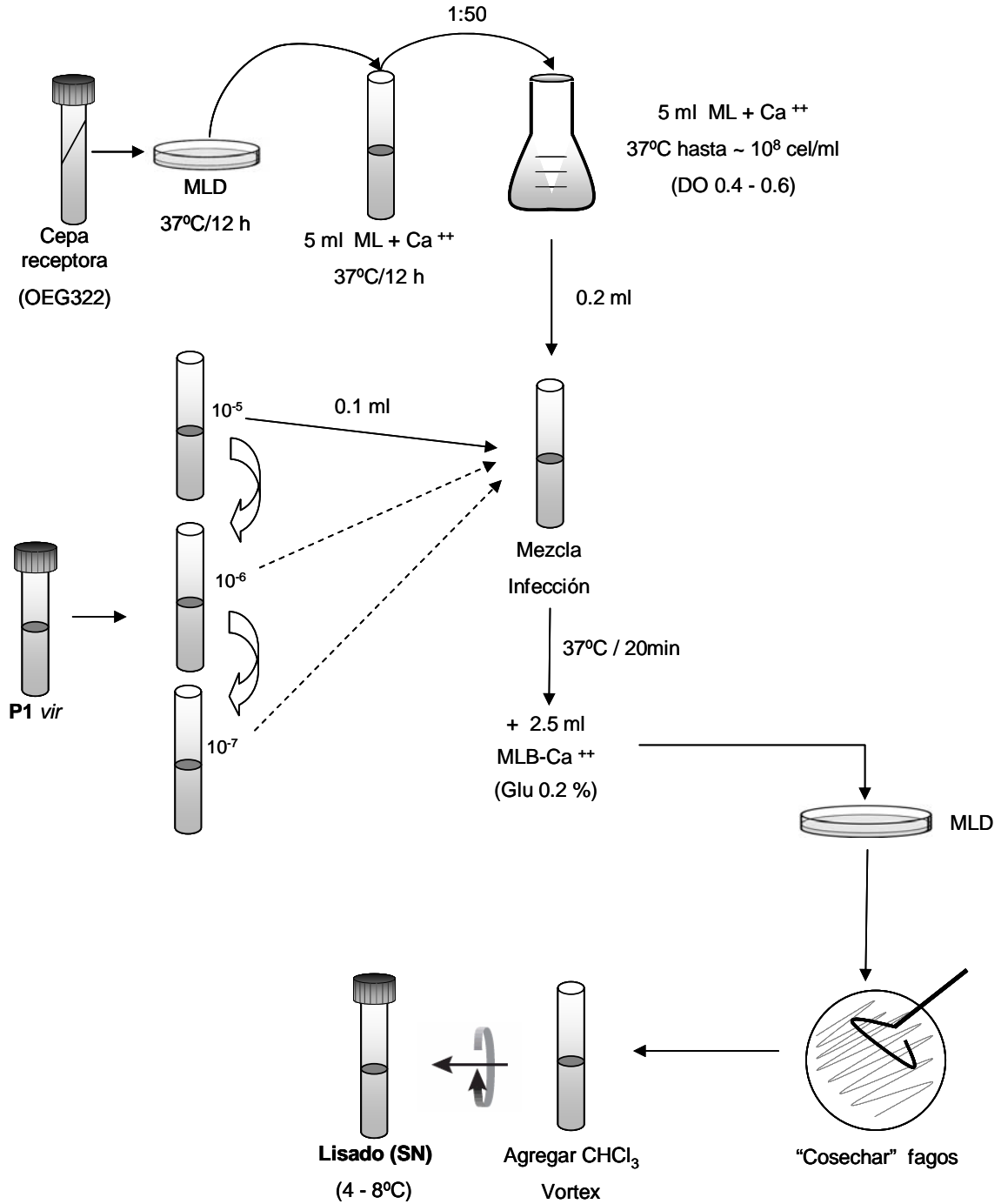
$$T \text{ (UFP/ml)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ UFP} \times \text{FD}}{\text{Vol siembra}}$$

Promedie aquellos valores que se encuentren en el mismo rango (descarte los valores extremos).

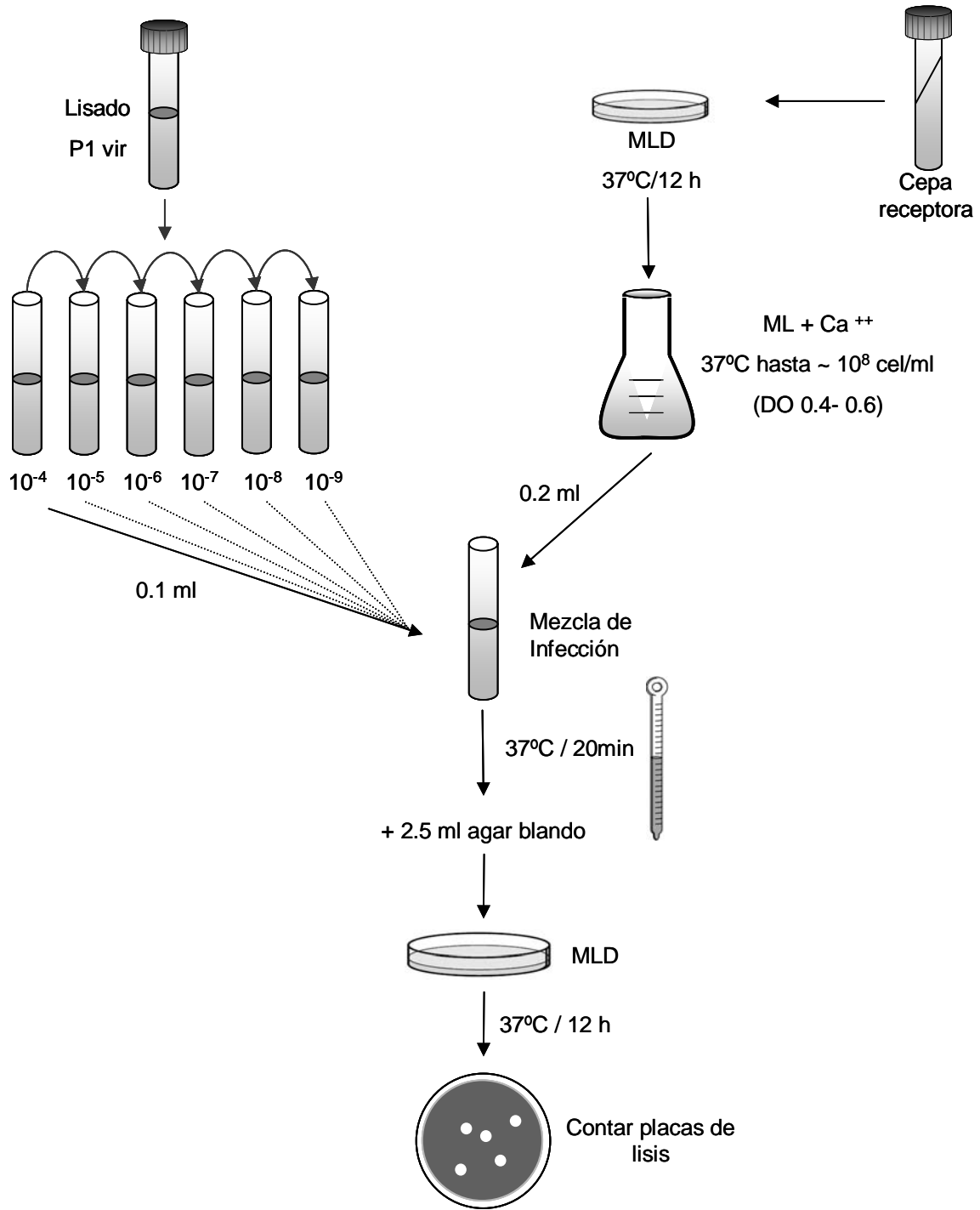
Vuelva a observar sus placas de Petri. Reconozca aquella donde se observa “lisis confluyente” (última dilución antes de observar lisis total). El aspecto de esta lisis confluyente es similar al de una tela araña. Esa es la dilución adecuada para multiplicar los fagos.

Añada 2 ml de medio L en la superficie de esta placa, raspe el agar blando con la ayuda de un rastrillo y recupere en un tubo de vidrio. Añada unas gotas de cloroformo y agite muy bien con la ayuda de un vórtex. Centrifugue por 10 min y recupere la fase superior. Transfiera a un tubo estéril, añada unas gotas de cloroformo y conserve en la nevera. Los fagos así preparados se conservan por períodos de tiempo bastante largos (< 1 año).

MULTIPLICACIÓN de FAGOS



TITULACION de FAGOS



$$\text{Titulo} = \text{UFP} * \text{F.D.} * \text{VOL}$$

Nomenclatura Genética

Hasta mediados de la década de los 60, la nomenclatura genética era una verdadera Torre de Babel. Debido a la ausencia de reglas claras para nombrar genes, cada investigador asignaba nuevos nombres de manera totalmente arbitraria, lo cual muchas veces tenía como consecuencia que el mismo nombre era asignado a diferentes genes o, por el contrario, diferentes nombres eran asignados al mismo gen. Para acabar con esta confusión, Demerec et al (1966, 1968) desarrollaron un sistema estándar de nomenclatura para los genes bacterianos. Con el desarrollo de nuevas herramientas genéticas, algunas modificaciones fueron introducidas posteriormente.

Las reglas básicas se describen a continuación.

GENOTIPO

Genes: a cada gen se le asigna una designación de tres letras, usualmente una abreviación de la vía metabólica en la que interviene el producto de ese gen o del fenotipo de los mutantes. Para representar el genotipo se utilizan letras minúsculas e itálicas. Los diferentes genes que afectan a una misma vía metabólica se distinguen por la inclusión de una letra mayúscula al final.

Por ejemplo, mutaciones que afectan la biosíntesis de las pirimidinas se designan *pyr*; el gen *pyrC* codifica para una enzima denominada dihidrorotasa y el gen *pyrD* codifica para la dihidrorotasa deshidrogenasa.

Alelos: a cada mutación en la vía metabólica se le asigna un número de alelo único. Una serie de alelos se utiliza para cada designación génica. Si no hay letras mayúsculas en el nombre del gen, se añade una barra diagonal antes del número de alelo.

Por ejemplo, *pyrC19* se refiere a una mutación particular en el gen *pyrC*. Con la finalidad de diferenciar entre cada mutación, no se asignará este número a ninguna otra mutación, cualquiera que sea el gen afectado. Los números alélicos deben utilizarse de manera secuencial y deben ser cuidadosamente monitoreados para asegurar que diferentes mutaciones no sean denominadas con el mismo número.

Inserciones: los elementos genéticos transponibles (transposones, secuencias de inserción) así como los plásmidos suicidas pueden insertarse a nivel del cromosoma bacteriano. Esta inserción puede ocurrir a nivel de un gen conocido o desconocido. Cuando una inserción ocurre en un gen conocido, la mutación se escribe utilizando el mismo código que se mencionó más arriba, añadiendo el símbolo :: y el tipo de elemento genético que se insertó. Por ejemplo, la inserción del transposón Tn10 en el gen *pyrC* (alelo 103) se designa *pyrC103::Tn10*. No se deben dejar espacios en blanco en la designación genética de la inserción.

Plásmidos: los plásmidos deben indicarse por una barra diagonal (/) que se escribe después del genotipo. Indicar el nombre del plásmido, el origen del mismo, y el genotipo/fenotipo relevante portado por este plásmido. La inserción de plásmidos suicidas en el cromosoma puede indicarse como se explicó para el caso de los transposones.

Fagos: los profagos y los plásmidos integrados al cromosoma en un sitio de inserción deben indicarse escribiendo el nombre del sitio de inserción, seguido del símbolo :: y el genotipo del fago escrito entre corchetes. Por ejemplo, *att::[P22mnt::Kan]*.

FENOTIPO

Crecimiento: generalmente es necesario distinguir entre el fenotipo de una cepa y su genotipo. El fenotipo se escribe utilizando la misma nomenclatura de tres letras que se utiliza para el genotipo, pero el fenotipo comienza con una letra mayúscula (no se usan itálicas en este caso!). Por ejemplo, la cepa TR251 cuyo genotipo es [*hisC527 cysA1349 supD*] tiene un fenotipo Cys⁺ His⁺ debido a que la mutación *supD* suprime la mutación ámbar en los dos alelos mutantes *cysA* y *hisC*.

Resistencia a antibióticos: se utiliza una designación de dos y tres letras indistintamente para designar la presencia de marcadores (genes) de resistencia a antibióticos. Ambas nomenclaturas son aceptadas, pero es esencial que no existan confusiones entre ellas. La resistencia y sensibilidad a un determinado antibiótico se señala con las letras mayúsculas R y S, respectivamente, escritas en forma de superíndice. Por ejemplo, Amp^R o Amp^S.

Amp/Ap = Ampicilina
Cam/Cm = Cloranfenicol
Gen/Gn = Gentamicina
Kan/Kn = Kanamicina
Spc/ = Spectinomycin

Str/St = Estreptomycin
Tet/ = Tetraciclina
Zeo/ = Zeomicina
Neo/ = Neomicina

Alelos condicionales: los alelos (mutantes) condicionales indicados en el genotipo, incluyendo el número alélico, se indican en el fenotipo escribiendo dos letras entre paréntesis para designar el fenotipo condicional. Por ejemplo, *leuA414*(Am). Nótese que por tratarse de un fenotipo, se usa una letra mayúscula.

(Ts) = mutación sensible a la temperatura
(Cs) = mutación sensible al frío
(Am) = mutación ámbar

(Op) = mutación ópalo
(Oc) = mutación ocre

Referencias.

Demerec, M., Adelberg, E., Clark, A. and P. Hartman (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, 54(1): 61-76.

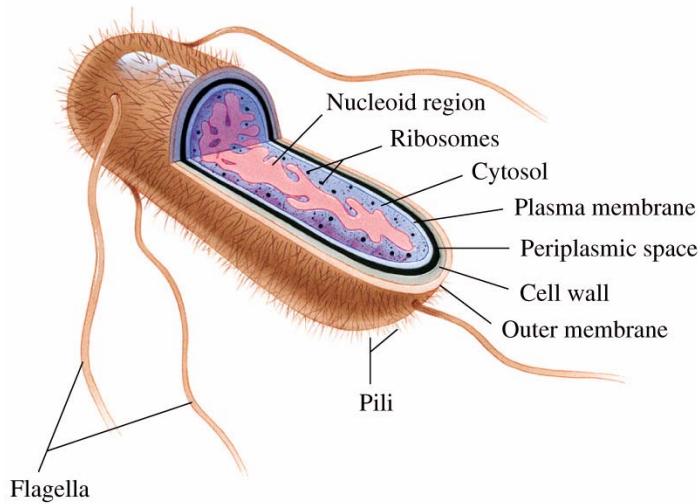
Demerec, M., Adelberg, E., Clark, A. and P. Hartman (1968). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *J. Gen. Microbiol.*, 50(1): 1-14.

Maloy, S.J. and D. Friefelder (1994). *Microbial Genetics*, Second Edition. Jones and Bartlett, M.A.

Journal of Bacteriology. Instructions to Authors. 2001. <http://jb.asm.org/misc/ifora.html>

Conociendo un poco más a *Escherichia coli*.

Escherichia coli es probablemente el organismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todo tipo de aspectos de genética y fisiología. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años (Blattner et al., 1997) y su biología general está bien estudiada, como demuestran claramente las diferentes ediciones del trabajo clásico coordinado por Neidhardt *et al.* (1987; 1996). También ha sido utilizada como organismo modelo en estudios de evolución experimental y genética de poblaciones para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y largo plazo (i.e., Papadopoulos et al., 1999; Souza et al., 2000).



Veamos algunas de sus características generales. *E. coli* es una bacteria Gram negativa típica de la familia Enterobacteriaceae. Desde el punto de vista morfológico, las células tienen forma de bacilo pudiendo presentar algunas estructuras denominadas “apéndices”: flagelos y pili. Su pared celular está estructurada en dos membranas (membrana externa y membrana interna o plasmática) separadas por un espacio periplásmico. El material genético se encuentra condensado en forma de un nucleóide bacteriano, visible con técnicas apropiadas de microscopía electrónica.

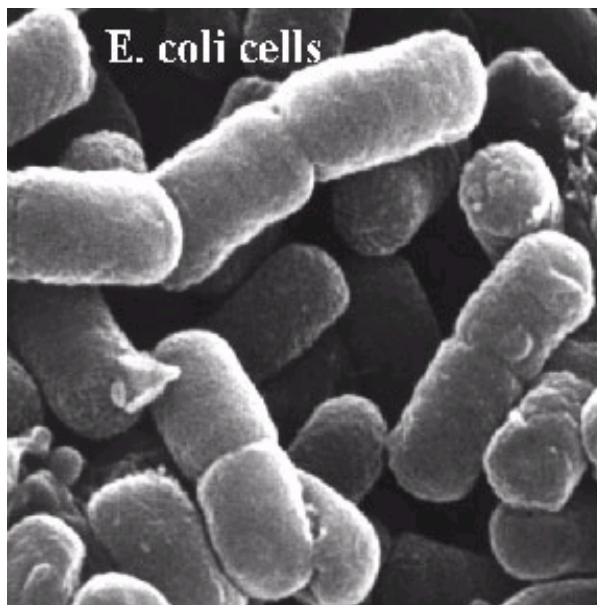
El análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias, misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacterias y a las cianobacterias (Logan, 1994). La subclase de proteobacterias incluye además a organismos patógenos de humanos, como son *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio* y *Haemophilus*. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser capaces de respirar de manera facultativa: anaeróbicamente, en el interior del intestino, y aeróbicamente, en el ambiente exterior. Gracias a esta capacidad muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros tantos son principalmente comensales de animales invertebrados y vertebrados o son patógenos de plantas (Logan, 1994).

En particular, *E. coli* prefiere utilizar azúcares sencillos como la glucosa, produce ácido y gas en presencia de lactosa y como no es capaz de fijar el N_2 atmosférico, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio para la síntesis de las biomoléculas (Brenner, 1984).

La cepa de laboratorio K12 de *E. coli* ha sido intensamente utilizada como un organismo modelo en gran cantidad de estudios; una variante de esta cepa, la MG1655, fue elegida para su secuenciación (cuando menos otra K12 en Japón y una cepa patógena del serotipo O157:H7 de esta especie también han sido secuenciadas). Esta cepa contiene 4,639,221 pares de bases de DNA circular de doble cadena, con un contenido promedio de GC del 50.8%, constituyendo su cromosoma. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para RNAs estables y 0.7% consiste en DNA repetido que no tiene función conocida. Esto nos deja con

alrededor del 11% del genoma con funciones de regulación. Dentro de los 4,288 marcos abiertos de lectura descritos (ORF en inglés), existe un 38% con función desconocida.

Debido a que un número importante de genes (al menos 755 genes en el cromosoma de la cepa MG1655) contienen diferentes proporciones de GC y un índice de uso de codones diferente al del resto del genoma, se considera que estos genes de *E. coli* han sido adquiridos por vía de transferencia horizontal (Lawrence y Ochman, 1998). Entre estos genes destacan las llamadas "islas de patogenicidad" (regiones donde se encuentran agrupados aquellos genes que confieren capacidades patógenas a una bacteria) (Ochman et al., 1999). Sin embargo, es posible que otras cepas de *E. coli* tengan fuertes diferencias en su estructura genómica, ya que se sospecha que los mapas no siempre son colineales y hay gran variación en el tamaño del genoma entre cepas (Shu-Lin et al., 1993; Bergthorsson y Ochman, 1995).



Esto es particularmente notable en el caso de la cepa patógena O157:H7 (Le Clerc et al., 1996).

El análisis comparativo entre genomas bacterianos secuenciados (i. e. Blattner et al., 1997; Decker et al., 1998; Kalman et al., 1999; Parkhill et al., 2000) y el estudio de la estructura genética de numerosas bacterias (Caugant et al., 1981; 1983; Istock et al., 1992; Musser et al., 1986) indica de manera definitiva que las bacterias no son los organismos estables que Gould (1994) sugería - "*the most salient feature of life has been the stability of its bacterial mode from the beginning of the fossil record until today and, with little doubt, into the future time so long as the earth endures*" -. La visión de Gould resultó ser miope, ya que si bien las bacterias han cambiado muy poco morfológicamente, su genoma es una entidad altamente dinámica y cambiante, que no ha dejado de evolucionar constantemente, aunque manteniendo un tamaño reducido y una aparente baja complejidad. Por otra parte, es interesante señalar que los datos obtenidos hasta la fecha señalan que el genoma bacteriano consiste en un mosaico de genes con diferentes historias evolutivas. Se ha sugerido que al menos 17% de los genes de *E. coli* son adquisiciones foráneas relativamente recientes (Lawrence y Ochman, 1998), con una tasa de transferencia horizontal de aproximadamente 16 kb cada millón de años (Martin, 1999).

Si el genoma de *E. coli* es dinámico, sus elementos extracromosomales (plásmidos) lo son aún más. En efecto, esta bacteria, que puede sobrevivir perfectamente sin ningún plásmido, puede tener en algunos casos un buen porcentaje de su genoma distribuido en este tipo de elementos genéticos (Hopwood y Chater, 1989). En efecto, se han descrito cerca de 300 plásmidos diferentes en distintas cepas de *E. coli* (Boyd et al., 1996.). El número y tipo de plásmidos dentro de una célula está regulado por dos fuerzas: el número de réplicas de un mismo plásmido dentro una bacteria - fenómeno controlado en parte por el mismo plásmido- y la entrada de nuevos plásmidos (por conjugación principalmente). Se ha reportado que los plásmidos pueden transferirse entre células de diferentes orígenes filogenéticos (i.e., géneros e inclusive familias diferentes pueden compartir los mismos tipos de plásmido), dándole capacidades nuevas e instantáneas a su hospedador (Lewin, 1998). Sin embargo, es interesante señalar que existe *incompatibilidad* entre plásmidos de un mismo grupo, por lo que no pueden ingresar a una bacteria dada nuevos plásmidos pertenecientes a un grupo ya presente en su citoplasma (Madigan et al., 2000).

La información contenida en estos elementos extracromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar genes cuyos productos participan en 1) la asimilación de azúcares raros, 2) la producción de colicinas - sustancias alelopáticas que matan a posibles competidores de la misma especie -, 3) la resistencia a antibióticos y a metales pesados, 4) la inmunidad contra fagos y colicinas, 5) el intercambio genético, 6) la síntesis de fimbrias relacionadas con la patogenicidad y 6) la producción de toxinas, entre otros (Lewin, 1998).

Esta gran plasticidad genómica de *E. coli* le confiere, a su vez, una versatilidad ecológica notable, ya que gracias a ella pueden adaptarse rápidamente diferentes ambientes. De esta manera, las bacterias pueden pasar de ser organismos de vida libre a ser comensales mutualistas del colon en los animales de sangre caliente, e inclusive ser patógenos mortales en humanos y animales.

Dónde vive, qué come, cuántos hijos tiene?

La densidad de *E. coli* en el intestino grueso es de uno a diez millones de células por gramo de heces. Esto hace de *E. coli* un componente menor de la flora predominantemente anaerobia de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de unas 10^{11} células por gramo (Selander et al., 1987). *E. coli* es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto y de las heces de su madre (Bettelheim, 1994). Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados. Usualmente existe una cepa dominante de *E. coli* por hospedero; sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión, hace que esta dominancia sea sólo temporal y que la dinámica esté dictada por procesos tanto aleatorios (deriva génica) como adaptativos (selección periódica) (Levin, 1981; Caughant et al., 1981). En el intestino se estima que hay una división por fisión binaria al día (Selander et al., 1987), valor muy pequeño si se considera que esta especie se puede dividir cada 20 minutos en condiciones óptimas, en un medio de cultivo rico. Se considera que en condiciones bajas de nutrientes como el agua y el lodo, el tiempo de bipartición de *E. coli* es aún menor que en el intestino.

Generalmente se considera que el habitat “normal” de *E. coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos) (Souza et al., 1999), Aunque esta especie puede encontrarse en el medio externo, tradicionalmente se pensaba que su presencia indicaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podía reproducir en el medio exterior (Atlas, 1990). Sin embargo, resultados recientes indican que esto es falso. Existen cepas de *E. coli* que viven en otras partes del tracto digestivo, como por ejemplo las cepas patógenas, que pueden multiplicarse en la sangre y en el tracto urogenital. Adicionalmente, es posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas particulares en ambientes acuáticos, especialmente aquellos que son ricos en compuestos orgánicos como las aguas negras (Cerritos, 1999; Parveen et al., 1999; Cruz, 2000). En estudios que utilizan marcadores genéticos, como alozimas y ribotipos, se ha observado que la diversidad genética es mayor en estos cuerpos de agua y que las cepas que allí se desarrollan no siempre son las mismas que colonizan el colon de los animales (Puppo y Richardson, 1995; Cerritos, 1999; Parveen et al., 1999; Cruz en revisión). También se ha demostrado que estas poblaciones ambientales pueden aumentar su densidad poblacional en el tiempo, lo cual sugiere que crecen y sobreviven en estos ambientes externos. Además, tenemos datos que sugieren que existen cepas de *E. coli* que sobreviven y se reproducen en el suelo (A.Valera com. pers.).

Tomado de: Historia natural, ecología y evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*
Valeria Souza, Martha Rocha, Luisa Sander y Luis E. Eguiarte

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-275, C.U., C.P. 04510, México D.F., México.

***E. coli* K-12 vista por Joshua Lederberg**

Theodor Escherich, un pediatra alemán del siglo XIX, aisló en 1885 una bacteria que denominó *Bacterium coli*, a partir de heces de individuos sanos. Esta bacteria se hallaba de manera casi universal colonizando el intestino grueso o colon de muchos pacientes, de allí el nombre *coli*. En 1919, la especie fue rebautizada *Escherichia coli*, con motivo de una revisión de la nomenclatura bacteriológica, para darle más especificidad a esta forma particular de *Bacterium*. Aunque desde el inicio se identificaron formas patógenas de esta misma especie, *E. coli* fue considerada como una especie representativa de organismos comensales, no patógenos, que podía ser cultivada muy fácilmente y sin mayores riesgos, aún en medio sintético. En medio rico, *E. coli* crecía con un tiempo generacional de 20 min; de allí que las colonias pudiesen ser visibles al cabo de 12 horas de incubación, cuando era plaqueada en medio agarizado. Otros medios de cultivo, como el Agar McConkey, fueron diseñados con el fin de aislar selectivamente a *E. coli*, desde el mismo momento en que comenzó a utilizarse como un indicador de la contaminación fecal de los embalses de agua para consumo humano. Por todo esto, *E. coli* era una especie bastante conocida por los bacteriólogos de la primera mitad del siglo XX. Sin embargo, fue raramente mencionada en textos de biología general, lo cual se debió —en parte— a una visión particular de las bacterias que las consideraba como organismos precelulares, de escasa complejidad, carentes de núcleo y otros elementos genéticos típicos de los *verdaderos* seres vivos.

La revolución conceptual que catapultó a las bacterias al campo de la genética molecular se remonta al año de 1944. Ese año, Avery, McLeod y McCarthy reportaron que los neumococos podían ser transformados de una forma inocua a otra extremadamente patógena, utilizando para ello preparaciones de ADN. Este experimento fue la primera demostración sólida del rol del ADN como portador de la información genética. Lamentablemente, no se podía aún establecer el nexo existente entre el fenómeno de la transformación y los genes, tal y como eran conocidos en organismos superiores; más aún, el “cruzamiento” de bacterias, al estilo de los trabajos de Mendel, para estudiar la recombinación y la segregación, era una idea muy poco probable. Estos fueron los retos que motivaron mi propio trabajo. Para el año de 1946, los experimentos sobre el intercambio de material genético y el ligamiento de genes, utilizando *E. coli* como organismo modelo, permitieron llenar el vacío existente en este campo.

E. coli fue escogida para estos estudios debido a la información disponible sobre la misma. Pronto, el Efecto Mathew comenzó a funcionar: la propia acumulación de conocimiento concentrado en una cepa particular, “K-12”, hizo de ella un prototipo para estudios ulteriores. Se demostró que esta cepa portaba un profago lisogénico (λ), lo cual favoreció el desarrollo de una *industria* científica específica; esta cepa porta, además, un cierto número de plásmidos, elementos genéticos extracromosomales que se pueden transferir por conjugación. Esto último fué lo que permitió establecer las bases para la manipulación de los genes, la ingeniería genética y la biotecnología moderna.

Existen muchos mitos acerca del origen de la cepa K-12, la cual —por cierto— no tiene nada que ver con “Kindergarten grado 12”, que es lo que usualmente se piensa en los USA. De hecho, la cepa K-12 fué aislada en la Universidad de Stanford en 1922, a partir de heces humanas, y fué conservada bajo esta denominación durante muchos años como una cepa más del cepario del Departamento de Microbiología. En 1940, Charles E. Clifton la utilizó para estudios del metabolismo del nitrógeno, y su colega Edgard L. Tatum la tomó prestada para su propio trabajo, relacionado con la biosíntesis del triptofano a partir del indol y la serina. La cepa K-12 entró en el dominio de la genética con los estudios pioneros de Tatum, estrechamente relacionados con la producción de mutantes auxótrofos en 1944. Estos trabajos fueron los que motivaron mi colaboración con Tatum, y lo que nos llevó al descubrimiento de la

recombinación sexual en las bacterias, en 1946. Desde entonces, *E. coli* K-12 ha sido utilizada en miles de trabajos científicos y hasta su genoma se conoce en los más mínimos detalles.

Visto retrospectivamente, podemos considerar que fuimos muy afortunados al escoger a K-12 para nuestros estudios. En efecto, con las técnicas disponibles en 1946, sólo 1 entre 20 cepas de *E. coli* habrían permitido obtener resultados satisfactorios al realizar experimentos de cruces entre cepas, dando origen al descubrimiento del Factor F que gobierna su comportamiento “sexual”. De la misma forma, de haber portado otros profagos diferentes de lambda, como el P1, la integración de los virus en el cromosoma bacteriano no hubiese podido ser puesta en evidencia.

Al cabo de decenas de años de cultivo en el laboratorio, la cepa K-12 perdió sus antígenos de superficie (antígenos O) lo cual tuvo consecuencias favorables, pues redujo su –de por sí escasa– virulencia. Por otra parte, esto dejó a K-12 fuera del campo de estudio de la patogénesis, lo cual permitió el estudio en profundidad de otras cepas como la O157, estrechamente relacionada con *Shigella*.

Algunas de las aplicaciones científicas más importantes de K-12 fueron en el estudio de la regulación de la expresión genética. De allí surgió el concepto del “operón” y el extraordinario trabajo desarrollado en el Instituto Pasteur de Paris. El Premio Nóbel otorgado a François Jacob y Jacques Monod, son sólo dos ejemplos de los muchos hitos científicos que pueden asociarse con el estudio de la cepa K-12. La literatura científica que alude a K-12 incluye más de 100.000 publicaciones; de hecho, Google reporta más de 3 millones de *hits* para la palabra “coli” en Internet.

Joshua Lederberg

Basado en material publicado en *Instruments of Science. An Historical Encyclopedia* (1997).

Crecimiento bacteriano

El crecimiento en organismos unicelulares como las bacterias resulta en multiplicación celular con aumento en el número de individuos. Este crecimiento puede ser medido en términos de dos parámetros diferentes: la densidad microbiana (o concentración celular) y la masa celular (peso seco ó peso húmedo). La densidad bacteriana puede, a su vez, determinarse mediante diferentes métodos, de los cuales las más utilizadas son la medida de la DO a 600 nm y la titulación. Generalmente, los valores de DO pueden transformarse en valores de UFC/ml (UFC= unidades formadoras de colonias, es decir, células viables), mediante la construcción de una curva patrón *ad hoc*.

Un aumento en la masa total no es necesariamente un reflejo de crecimiento bacteriano, ya que puede resultar de la síntesis y acumulación de materiales de reserva celular y no de la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos que constituirán los nuevos individuos. A nivel celular, la masa y el volumen aumentan en forma continua durante el crecimiento, mientras que la multiplicación es un proceso discontinuo. Esta diferencia puede observarse cuando el crecimiento es sincrónico, es decir cuando todas las células de la población se dividen “en fase”. Sin embargo, usualmente la multiplicación en cultivos celulares no es sincrónica. Bajo estas condiciones, los ciclos individuales de crecimiento se solapan en el tiempo y el aumento de la población puede expresarse tanto en masa celular como en número de células, pues ambos son equivalentes.

Bajo condiciones favorables de crecimiento, una población bacteriana se duplica a intervalos regulares, ya que cada una de las dos células hijas producidas en una división tiene el mismo potencial de multiplicación que la célula parental que les dio origen.

Curva de crecimiento bacteriano.

Consideremos una población bacteriana que se desarrolla a partir de una sola célula, la cual se divide exponencialmente cada 30 minutos: esto da lugar a un clon bacteriano, cada uno de cuyos individuos se duplica cada 30 min. El número total de bacterias (N_T) en cada generación (n) puede calcularse de la siguiente manera

$$N_T = 2^n$$

En principio este crecimiento es discontinuo, y la representación gráfica corresponde a una curva en escalera que traduce el sincronismo de la población.

Si, por el contrario, en lugar de partir de una sola bacteria hubiésemos partido de una población de N_0 bacterias que se divide simultáneamente, el tamaño de la población N_T en generaciones sucesivas puede ser determinado de la siguiente manera:

$$N_T = N_0 * 2^n$$

La velocidad de crecimiento durante la fase exponencial puede ser calculada a partir de la siguiente relación:

$$N_T = 2kt * N_0$$

donde k es igual a la velocidad de crecimiento exponencial (tasa de crecimiento) y usualmente se expresa como el número de duplicaciones por hora.

La forma logarítmica de esta ecuación es

$$\text{Log}_2 (N_T / N_0) = kt$$

Despejando,

$$k = (\log_2 N_T - \log_2 N_0) / t$$

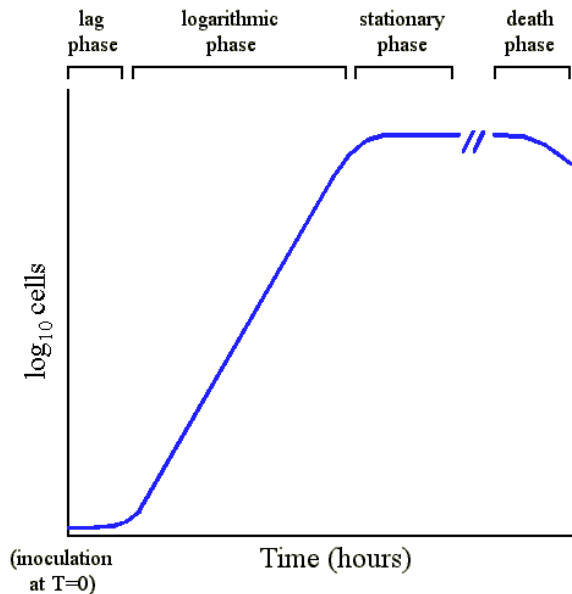
El tiempo que tarda la población bacteriana en duplicarse es lo que se llama tiempo de generación (T_g) y su valor es igual al inverso de la velocidad de crecimiento:

$$T_g = 1 / k$$

Fases del crecimiento bacteriano.

El crecimiento de poblaciones bacterianas está limitado generalmente por diversos factores: el agotamiento de algún componente del medio de cultivo, las variaciones en las condiciones fisicoquímicas, la acumulación de metabolitos tóxicos, etc. Estos cambios en el medio de cultivo son producidos por el propio crecimiento de los microorganismos. Una vez que el crecimiento ha cesado, la población comienza a declinar como resultado de la muerte de sus individuos. Todos estos elementos determinan la forma típica de la curva de crecimiento de cultivos donde los nutrientes y el medio no son renovados (cultivos en *batch*). Generalmente en el laboratorio se realizan este tipo de cultivos, que se distinguen de los llamados cultivos continuos.

El crecimiento normal de un cultivo en *batch* puede ser dividido en fases:



1) **Fase de latencia o fase lag:** durante esta fase no hay aumento de la población bacteriana, por lo que la tasa de crecimiento es igual a cero. Por el contrario, durante esta fase hay aumento del volumen celular del protoplasma total y del contenido de ribosomas. También ocurren alteraciones metabólicas y fisiológicas de las células como por ejemplo aumento de la respiración, mayor susceptibilidad a los desinfectantes, etc.

Cuando se transfiere un inóculo importante de un cultivo creciendo exponencialmente a un medio del mismo tipo, la fase *lag* resulta minimizada. Si en cambio se transfiere un inóculo muy pequeño, el inicio del crecimiento puede verse afectada por trazas de inhibidores presentes en el medio (jabón, metales pesados) o por la baja concentración de CO₂.

2) Fase de crecimiento acelerado: durante esta fase la tasa de crecimiento aumenta. La duración de esta fase, así como la de la fase anterior, puede variar considerablemente.

3) Fase exponencial o fase *log*: durante esta fase las bacterias se dividen a su máxima velocidad, por lo que el crecimiento aumenta a una velocidad logarítmica constante. La tasa de mortalidad es nula y por ende la concentración celular total es igual a la concentración de células viables.

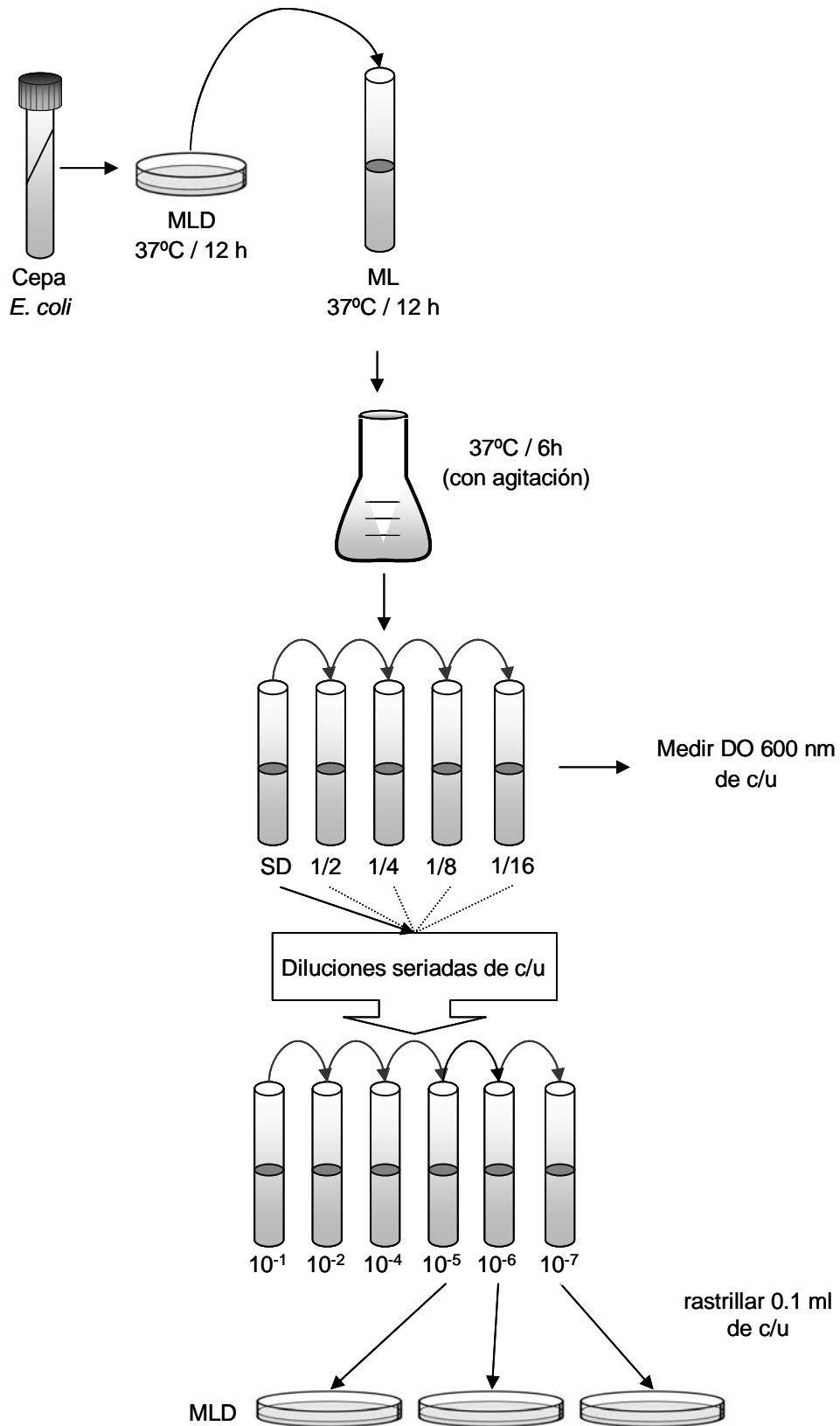
La velocidad de crecimiento depende de factores genéticos y ambientales. La tasa máxima de reproducción de un determinado microorganismo en condiciones óptimas, es característica propia de la especie, y difiere por lo tanto de una especie a otra. Los factores ambientales que afectan la velocidad de crecimiento incluyen **a)** la naturaleza y concentración de nutrientes, **b)** la temperatura, **c)** el pH del medio, y **d)** la fuerza iónica del medio.

4) Fase de crecimiento retardado: durante la cual la velocidad de crecimiento disminuye. Corresponde al período en el cual algún factor comienza a ser limitante para mantener la tasa de crecimiento máxima. En esta fase puede comenzar a disminuir el número de células viables.

5) Fase estacionaria: en esta etapa las células se hacen mucho más pequeñas (hasta por un factor de 4) y sufren cambios notables en su composición. En particular, los ribosomas no se producen más y, por el contrario, comienzan a degradarse liberando aminoácidos y nucleótidos que se utilizan para posteriores divisiones, sin aumento de masa total. El cese del crecimiento puede ser la consecuencia del agotamiento de algún nutriente, la disminución de la concentración de oxígeno disuelto, o la acumulación de algún producto inhibitorio.

6) Fase de declive o muerte: al cabo de un cierto tiempo en fase estacionaria, las células pueden comenzar a lisarse o a perder viabilidad progresivamente, dependiendo de la especie. La liberación de sustancias procedentes de la degradación de los ácidos nucleicos (pentosas, fosfato y bases nitrogenadas) y de las proteínas (amoníaco y cetoácidos) al medio extracelular produce el fenómeno de crecimiento críptico, también llamado canibalismo. De esta manera puede mantenerse la viabilidad de una subpoblación de células a expensas de otras.

CURVA DE CALIBRACIÓN



CONJUGACION BACTERIANA

1. CONCEPTO Y APROXIMACIÓN HISTÓRICA

La conjugación bacteriana es el proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, promovido por determinados tipos de plásmidos, y que requiere contactos directos entre ambas, con intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas.

El descubrimiento de la transformación había revelado ya la existencia de recombinación genética entre porciones de genomas bacterianos. En mitad de los años 40, la pregunta que se planteaba era: ¿existe algún tipo de recombinación bacteriana que suceda al estilo de la reproducción sexual de los eucariotas?

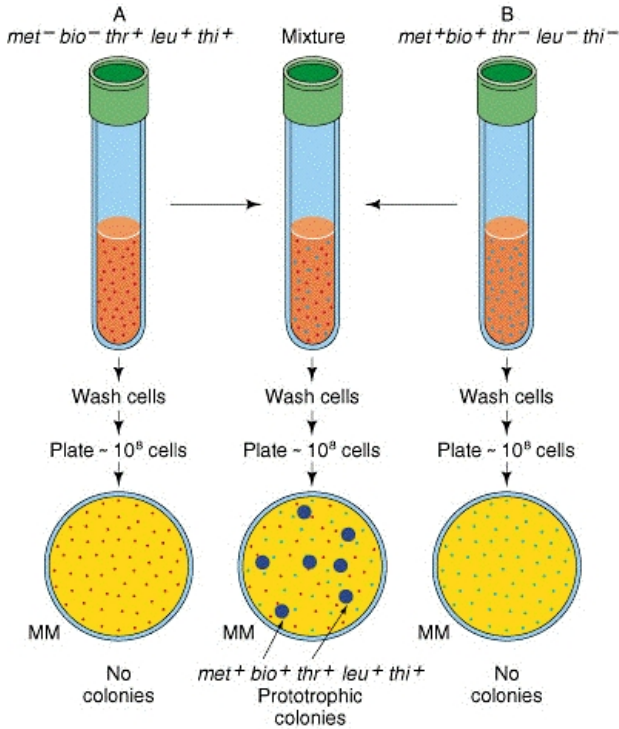
Se descubrió que ciertas bacterias presentan una forma de recombinación que recordaba en algunos rasgos a la sexualidad: un tipo de célula donadora ("macho") donaba directamente parte de su material genético a otro tipo (la receptora, equivalente a la "hembra"), con ulterior recombinación entre ambos. A este fenómeno se le denominó conjugación, por su similitud aparente con lo que sucede en eucariotas. Sin embargo, como veremos enseguida, la conjugación no es una forma auténtica de sexualidad al estilo de los eucariotas.

Con la perspectiva de los años, se puede decir que el descubrimiento de la conjugación bacteriana fue uno de los más fortuitos, pero al mismo tiempo, de los más felices y trascendentales de toda la Biología del siglo XX. Muchos biólogos habían intentado infructuosamente demostrar conjugación de tipo "sexual" en bacterias. Lederberg y Tatum (1946), que a la sazón investigaban en la Universidad de Yale, tuvieron la enorme suerte de "escoger" (sin saberlo a priori) una de las pocas especies bacterianas (*Escherichia coli*) que presentan sistemas naturales de conjugación, y aún más, la cepa concreta denominada K12, que llevan uno de estos sistemas... Pero todavía mejor: como se descubriría muchos años después, el sistema conjugativo de dicha cepa es casi único por su capacidad de conjugación permanente, no estando sometido a los controles negativos típicos de la inmensa mayoría de los demás sistemas que luego se descubrieron. En resumen, un extraordinario "golpe de suerte" en el año 1946 dio el "pistoletazo de salida" para una de las épocas más gloriosas de la Biología, contribuyendo de modo excepcional al origen de la Biología Molecular.

A continuación expondremos los hitos más importantes en el estudio de la conjugación en *Escherichia coli* K12.

1.1 EXPERIMENTOS DE LEDERBERG Y TATUM

Joshua Lederberg y Edward Tatum (1946) mezclaron dos cepas doblemente auxótrofas, dotadas de distintos marcadores genéticos:



Una de ellas presentaba auxótrofias para la metionina y la biotina, mientras que la otra era incapaz de crecer en ausencia de treonina, leucina y tiamina. Sin embargo, al mezclar ambas cepas por un determinado período de tiempo y sembrar la mezcla en un medio mínimo, se observó la aparición de colonias recombinantes protótrofas (met^+ , bio^+ , thr^+ , leu^+ y thi^+).

¿Qué proceso de transferencia genética había dado origen a los recombinantes? Se descartó que fuera por transformación:

No había recombinantes si se usaban extractos libres de una cepa y se mezclaban con células enteras de la otra cepa.

Si en el experimento original se añadía DNasa, no cambiaban los resultados.

Se vio que se necesitaban contactos directos entre las células de las dos cepas, mediante el experimento del tubo en "U" de Davis: si en cada rama de la U se coloca una cepa distinta, y ambas están separadas físicamente (en la base de la U) por un filtro con poros de tamaño inferior al del diámetro de las bacterias, no aparecían recombinantes.

En posteriores experimentos se comprobó que existían dos tipos de cepas de cara a la producción de recombinantes:

cepas fértiles (F^+): aquellas que al mezclarlas con otras, daban lugar a recombinantes;

cepas infértiles (F^-).

Los cruces de tipo $F^+ \times F^-$ dan origen a recombinantes;

Los cruces de tipo $F^- \times F^-$ no dan origen a recombinantes.

Por otro lado, se observaron dos importantes propiedades de los cruces $F^+ \times F^-$:

casi la totalidad de las células infértiles (F^-), al final de la conjugación, adquirirían la capacidad de fertilidad (se convertían en células F^+); sin embargo, los recombinantes aparecían con mucha menor frecuencia (alrededor de 10^{-5}).

El origen de ambos fenómenos estriba en la posesión, por parte de las células F^+ , del llamado "factor sexual o factor de fertilidad F ", (que hoy sabemos que es un plásmido, pero tal extremo

se desconocía aún en esa época). Por lo tanto, de alguna manera el factor F debía de tener la doble capacidad de transferirse con alta frecuencia (casi el 100%) a las células F^- , y de dar origen en ellas a recombinantes, pero con mucha menor frecuencia (10^{-5}). ¿Cómo explicar esta doble capacidad del factor F, con dos frecuencias tan diferentes? Las bases para la respuesta a esta pregunta fueron colocadas en el siguiente gran capítulo de esta historia:

1.2 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS Hfr POR LEDERBERG Y HAYES

En los años de 1950 Joshua Lederberg y William Hayes, cada uno por separado, aislaron un nuevo tipo de cepas fértiles a partir de las cepas F^+ originales, cuyas propiedades distintivas respecto de las cepas F^+ eran:

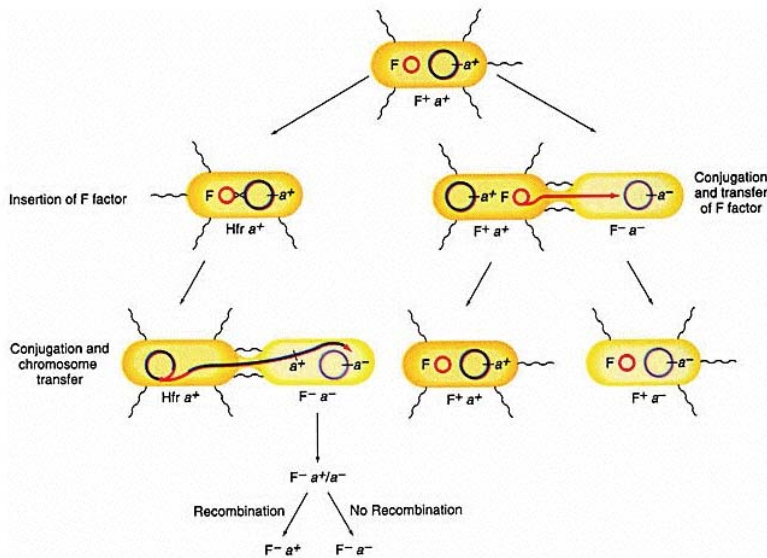
a. Provocaban fertilidad (o sea, daban recombinantes al cruzarlas con F^-) con una frecuencia muy alta (unas 1000 veces superior a la de las cepas F^+). Por ello, el nombre que se dio a este nuevo tipo de cepas fértiles fue el de Hfr (iniciales, en inglés, de alta frecuencia de recombinación).

b. A diferencia de las F^+ , las cepas Hfr no suelen convertir en fértiles a las cepas F^- tras el cruce conjugativo con ellas.

Entonces, la pregunta obvia era: ¿qué relación existe entre las células Hfr y las células F^+ de las que parecen derivar?

1.3 EI MODELO DE CAMPBELL

Alan Campbell propuso en 1962 un modelo hipotético que posteriormente se vio confirmado por otros experimentos, y que daba cuenta del comportamiento de las cepas F^+ de Lederberg y de las Hfr de Lederberg y Hayes:



En las células F^+ el factor de fertilidad F se encuentra en forma de plásmido de replicación autónoma, independiente del cromosoma. En este estado, el factor F sólo puede provocar su propia transferencia conjugativa a las células F^- , de modo que éstas adquieren a su vez dicho factor F.

En una población de células F^+ , de vez en cuando (con una frecuencia de 10^{-5}), el factor F interacciona con el cromosoma: se integra en él, y entonces se replica

conjuntamente con el cromosoma de la bacteria (actuando, pues, como episoma). En esta situación, el factor F puede "arrastrar" al cromosoma y transferir parte de él a la célula receptora F^- . Sin embargo, en esta situación el factor F no se transfiere completo a la célula receptora, razón por la cual los cruces $Hfr \times F^-$ no suelen conferir el carácter F^+ a los exconjugantes del receptor.

En resumen: cada cepa Hfr es clon procedente de un evento de integración del factor F en un sitio del cromosoma de *E. coli*. En estos clones todas las células tienen la capacidad de

transferir porciones de cromosoma y por ello confieren alta frecuencia de recombinación. Así pues, en un cultivo F⁺ normal, existe una pequeña proporción de células Hfr. Esa minoría de células Hfr son las responsables de la baja frecuencia de recombinantes que provocan los cultivos F⁺.

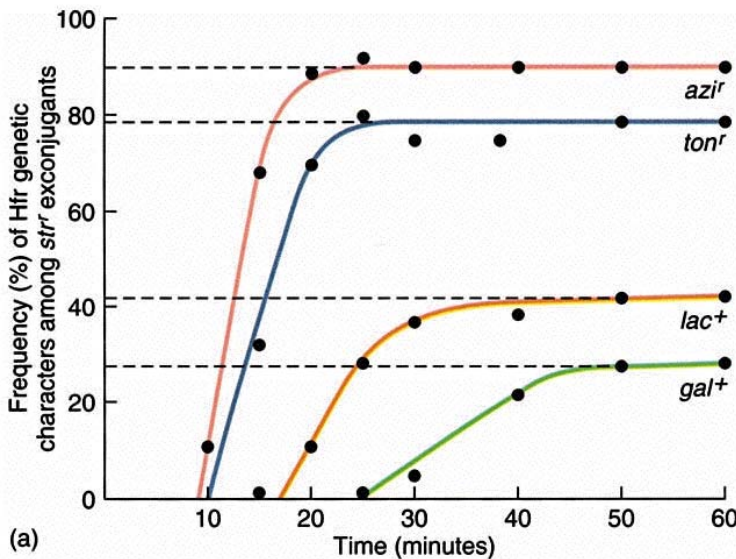
El análisis del proceso de conjugación y de la transferencia de marcadores cromosómicos se vio grandemente impulsado una vez disponibles las cepas Hfr puras. Se fueron obteniendo diversas cepas Hfr, cada una de las cuales se caracterizaba por una mayor eficiencia de transferencia de determinados marcadores (ver más adelante). El siguiente gran avance en el estudio de la conjugación se produjo trabajando sobre una de estas cepas, la denominada HfrH (la "H", en honor de Hayes).

1.4 EXPERIMENTOS DE LOS CRUCES INTERRUMPIDOS DE JACOB Y WOLLMAN

Estos autores, que trabajaban en el Instituto Pasteur de París, realizaron a partir de 1956 una importantísima serie de experiencias, que demostraron que la transferencia conjugativa tiene una polaridad (un sentido determinado): la transferencia de ADN por cada cepa Hfr es unidireccional y linear, o sea, los genes del donador van entrando al receptor en un orden determinado.

Imaginemos una cepa Hfr con un juego de marcadores (A⁺, B⁺, C⁺, D⁺, F⁻, G⁻), y una cepa F⁻ con el juego opuesto (A⁻, B⁻, C⁻, D⁻, F⁺, G⁺). Mezclamos ambas cepas, y a distintos tiempos extraemos alícuotas, y las agitamos fuertemente, con objeto de deshacer las parejas que se estaban conjugando (de ahí el nombre de "cruces interrumpidos" que recibe el experimento). Cada una de estas alícuotas es sembrada en un medio mínimo suplementado con los requerimientos correspondientes a los marcadores A, B, C y D (obviamente, en este medio, sólo puede crecer la cepa receptora). Tras incubar las placas, se obtienen colonias derivadas de la cepa receptora, procedentes de las mezclas de conjugación.

Ahora realizamos réplicas en placa (p. ej., por el método del tampón de terciopelo), "copiando" los transconjugantes en sendas placas de medio mínimo suplementadas con mezclas de 3 de los 4 requerimientos que originalmente le hacían falta a la cepa receptora. Mediante esta forma, lo que pretendemos es ver la posible adquisición de las versiones silvestres de los marcadores (mutantes) de esa cepa, versiones que obviamente habrá debido de adquirir tras transferencia conjugativa de partes de cromosoma procedentes de la cepa donadora. Se anota la frecuencia de aparición de cada alelo silvestre, y los resultados se representan en función de los tiempos a los que se extrajeron e interrumpieron las muestras del cruce conjugativo (ver gráfica).



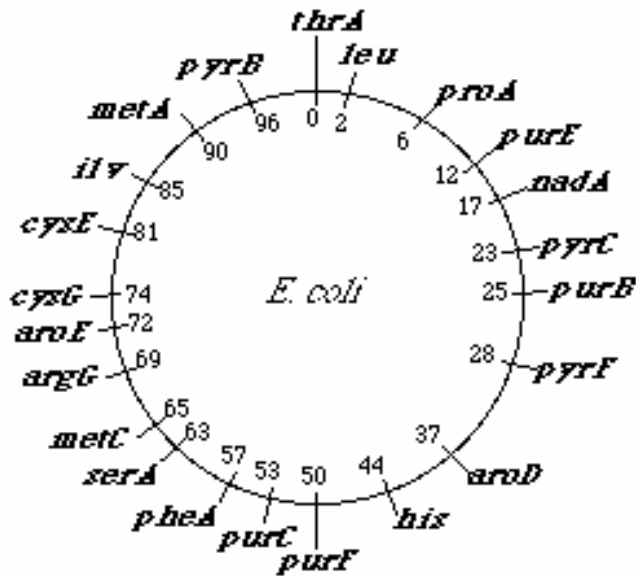
De la representación gráfica de porcentaje de recombinantes (eje de ordenadas) en función del tiempo de conjugación (abscisas) se deduce lo siguiente:

1. Cuanto más tiempo se deja la conjugación sin interrumpir, más material genético se transfiere.
2. Los genes van entrando ordenada y secuencialmente. La frecuencia relativa obtenida para cada marcador (es decir, el n° final de recombinantes) está

en relación (inversa) con el tiempo en que éste comienza a aparecer (a menor tiempo de aparición, mayor frecuencia final de ese marcador). Cada marcador tiene un tiempo de entrada inicial característico (que en la gráfica se manifiesta por el punto del eje de abscisas cortado por la curva).

3. Cada marcador da una curva con una pendiente característica. El hecho de que exista pendiente (y no que exista una recta en vertical desde el momento de aparición del marcador) implica que cada marcador no entra a la población de bacterias receptoras "de un tirón", sino que algunas células lo reciben antes y otras después, dentro de un cierto rango de tiempos. La existencia de una meseta final significa que a partir de un punto ya no entra más marcador (es decir, ya se ha producido toda la transferencia de ese marcador).

Resumiendo las consecuencias de este experimento: En la conjugación Hfr × F⁻ el cromosoma entra en la célula receptora con una orientación determinada, de modo que los genes entran ordenada y secuencialmente. El tiempo en que comienza a detectarse un determinado marcador, así como la frecuencia final de dicho marcador en los transconjugantes dan una estimación de su distancia respecto del origen de transferencia. La correlación entre tiempo de aparición y frecuencia final del marcador sugiere que las parejas de cruce donador-receptor se separan espontáneamente en algún momento de la conjugación; de no existir tal separación espontánea, se terminarían obteniendo frecuencias del 100% para cada marcador individual, incluidos los más alejados del origen de transferencia



Precisamente esto último es la base por la que se aprovecha el sistema de conjugación para la elaboración de mapas genéticos del cromosoma bacteriano. Como este aspecto es tratado oportunamente en la asignatura de Genética, nosotros no vamos a insistir más en él, aparte de recordar que fue precisamente utilizando distintas cepas Hfr como se comprobó genéticamente que el cromosoma de *E. coli* es, en efecto, circular.

La unidad de medida en el mapa genético de la bacteria es el minuto. El cromosoma de *E. coli* tiene unos 100 minutos; si tenemos en cuenta que el cromosoma mide 4.200.000 pares

de bases (pb), esto significa que la transferencia cromosómica promovida por F se da a razón de 4.200 pb/min, es decir, unas 700 pb/seg.

Existen 22 tipos distintos de cepas Hfr. Cada una se caracteriza por poseer el factor F en un punto concreto del cromosoma de *E. coli*, y de transferir ese cromosoma con un sentido determinado. Existen pares de cepas Hfr cuyo factor F está integrado en la misma localización del cromosoma, pero que transfieren cromosoma en sentidos opuestos: los marcadores que una de ellas transfiere en primer lugar son los últimos que transfiere la otra cepa Hfr.

2. ESTUDIO DE LA CONJUGACION PROMOVIDA POR EL PLÁSMIDO F DE *E. coli*

2.1 DESCRIPCIÓN DEL PLÁSMIDO F Y DE SUS FUNCIONES BÁSICAS

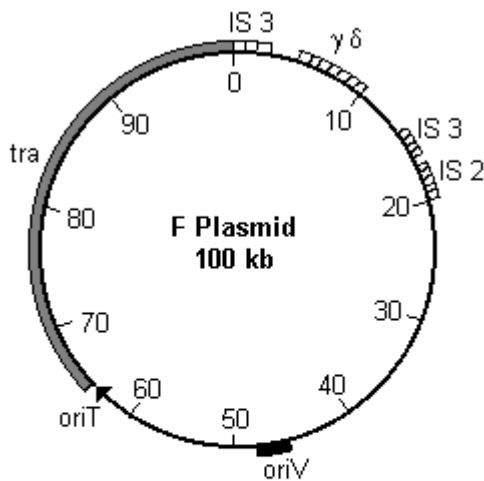
El factor responsable de la fertilidad de *E. coli* K12, o sea, el plásmido F, es un ejemplo de plásmido conjugativo que tiene la capacidad de interactuar con el cromosoma bacteriano para integrarse en él (episoma). El factor F puede encontrarse en uno de tres posibles estados:

- ◆ autónomo, en las células F⁺;
- ◆ integrado (como episoma), en las células Hfr;
- ◆ autónomo, con un trozo de cromosoma en su estructura, en células F'

En estos tres estados realiza el mismo tipo de funciones esenciales.

Estructura física:

- ◆ ADN circular de cadena doble, cerrado covalentemente (C.C.C.);
- ◆ superenrollado negativamente (requiere la acción de la girasa);



IS 3 & IS 2 = insertion sequences
 γδ = transposon Tn1000
 oriV = origin of replication
 oriT = origin of conjugal transfer
 tra = tra functions

tamaño: 100 kilobases. El mapa físico de F posee coordenadas en kb de 0 a 100 (obviamente el 0 y el 100 son el mismo punto), tomando como punto arbitrario de referencia (0/100) el borde izquierdo de la secuencia de inserción IS3a.

Organización genética y funcional: Se han identificado unos 60 genes en el plásmido F. Vamos a echar una ojeada al mapa de F para describir los principales grupos de genes según las funciones que realizan:

1. Porción tra (genes que codifican funciones relacionadas con la transferencia conjugativa). Existen unos 25 genes tra, repartidos en unas 33 kb (o sea, casi la tercera parte de F está dedicado a genes de conjugación). La mayor parte de esos genes están formando parte de un gran operón traY.....Z (unos 20 genes). Los genes tra son necesarios para la biosíntesis y ensamblaje de los pelos sexuales, la estabilización de los agregados de conjugación, el metabolismo del ADN durante la

conjugación, la regulación genética de la transferencia y la exclusión de superficie.

2. Regiones para la replicación vegetativa del plásmido F (oriV);

3. Existen varias secuencias de inserción: dos copias de IS3, una copia de IS2 y una copia de Tn1000. Precisamente son estas secuencias de inserción las que permiten la integración de F en varios lugares del cromosoma, por medio de recombinación homóloga con elementos

similares del genóforo bacteriano. Aludiremos a esto de nuevo, cuando tratemos el origen de las cepas Hfr y de las cepas F'.

4. Observen que existen dos secuencias ori (es decir, orígenes de replicación). Una de ellas, la oriV actúa como origen de replicación vegetativa, y la otra (oriT, de unas 300 pb) es el origen para la transferencia conjugativa, que como veremos enseguida, implica un tipo especial de replicación.

2.2 FISIOLÓGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CONJUGACIÓN

Podemos distinguir en la conjugación dos grandes fases:

- ◆ **contactos** entre células F⁺ (o, en su caso, Hfr) y F⁻;
- ◆ **transferencia** del ADN.

2.2.1 CONTACTOS ENTRE CÉLULAS F⁺ Y F⁻

Las células F⁺ (o las Hfr) forman de 1 a 10 pelos sexuales. El pelo interacciona específicamente, a través de su punta, con un receptor de la célula F⁻ (concretamente, parece ser que se trata de la proteína OmpA, de la membrana externa). En los cruces se ha visto que más que parejas de cruce existen agregados de cruce, donde varias células de ambos tipos (hasta unas 20) se encuentran relacionadas por contactos directos. Las cosas ocurren de la siguiente manera:

Una célula F⁺ contacta por medio de la punta de su pelo F con el receptor de superficie de una F⁻. El pelo F se va despolimerizando desde su base, lo cual provoca la apariencia de que se va retrayendo. En ese movimiento de retracción, la célula F⁻ se va acercando a la F⁺. Cuando el pelo se termina de desintegrar, las células se ponen en contacto directo pared-pared. Se forma un puente conjugativo que pone en contacto los citoplasmas de ambas células. Tras cierto tiempo de conjugación, el agregado se desagrega de forma activa.

Aquí hablaremos de un fenómeno interesante, que tiene que ver con las interacciones entre superficies celulares: se trata de la **exclusión superficial**, y consiste en un sistema por el que se evita que las células de tipo F⁺ puedan actuar como receptoras frente a otras F⁺.

Otro fenómeno que se puede observar en los cruces F⁺ × F⁻ es la **zigosis letal**. Ocurre cuando la proporción de células F⁺ es muy superior a la de F⁻ (p. ej., de 10:1). En este caso, las células receptoras pueden morir, debido a que están siendo modificadas en muchos puntos de su superficie por numerosos contactos con células F⁺.

2.2.2 TRANSFERENCIA Y PROCESAMIENTO DEL ADN CONJUGATIVO

La transferencia de ADN desde una célula F⁺ a una F⁻ es un proceso especial de replicación asimétrica por círculo rodante.

Una de las dos cadenas parentales del plásmido F pasa a la célula receptora, replicándose en ella;

La otra cadena parental se queda en el donador, sirviendo a su vez como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Esto explica porqué las células F⁺ siguen siendo F⁺ tras la conjugación.

Por lo tanto, la transferencia de ADN no implica que la doble hélice de F desaparezca del donador para aparecer en el receptor, sino que al final, ambos miembros de la pareja poseen un plásmido F completo.

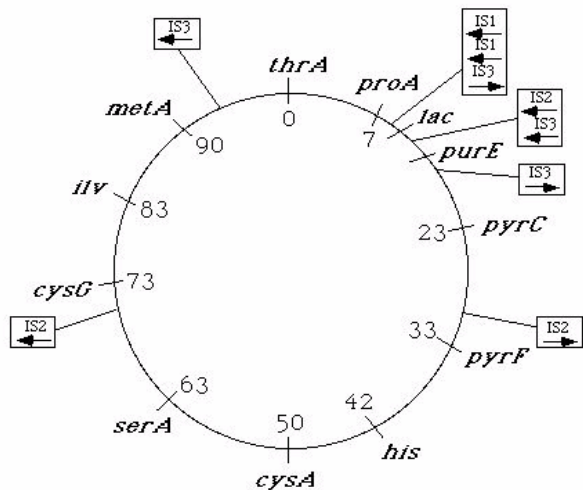
Durante el proceso de transferencia de la cadena rota en el receptor, se están dando dos procesos de síntesis de ADN: por una lado, la cadena intacta de F del donador sirve como molde para sintetizar la correspondiente cadena complementaria (que es idéntica, claro está, a la cadena desplazada hacia el receptor); y al mismo tiempo, en el receptor, la cadena transferida, conforme va entrando, va sirviendo para sintetizar la cadena complementaria. De este modo, al final, el donador sigue siendo F⁺, y el receptor se ha convertido en F⁺.

En el caso de cruces Hfr × F⁻, al menos una parte del fragmento cromosómico "arrastrado" desde el donador al receptor se recombina, con un doble entrecruzamiento (por el sistema de RecA) con la porción homóloga del endogenote, lo que lleva a sustitución de unas secuencias por las otras.

3. INTERACCIONES DEL PLÁSMIDO F CON EL CROMOSOMA

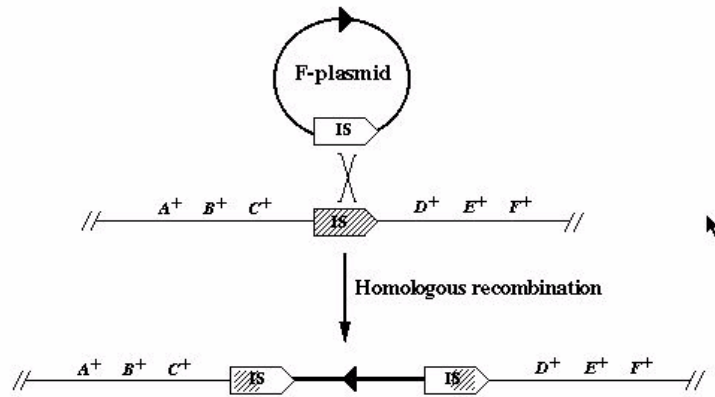
3.1 FORMACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS Hfr

Como ya dijimos, el plásmido F puede pasar desde su estado autónomo a un estado integrado en el cromosoma bacteriano (episoma), lo que es el origen de la creación de las cepas Hfr. Veamos ahora la base genético-molecular de este proceso:

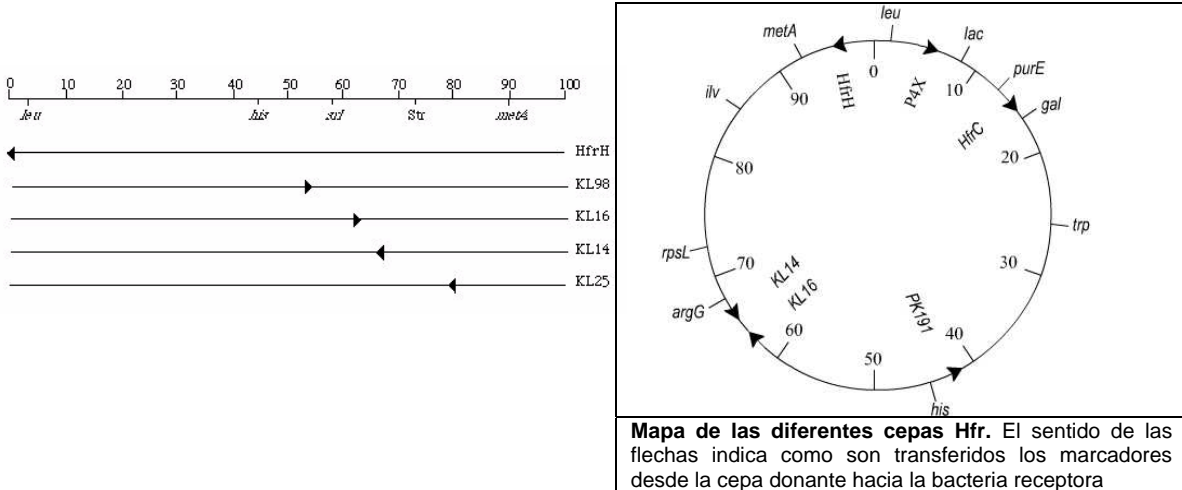


Se da una recombinación entre secuencias homólogas presentes simultáneamente en el plásmido F y en el cromosoma, que son secuencias de inserción. Concretamente, en F existen 2 copias de IS3, 1 copia de IS2 y una copia de Tn1000, y en el cromosoma hay varias copias de IS. Esta recombinación se da principalmente debido a la actuación del sistema de recombinación homóloga (dependiente de RecA), de modo que las IS funcionan aquí como regiones portátiles de homología implicadas en eventos de recombinación homóloga con un sobrecruzamiento ("crossing-over") sencillo.

Sin embargo, en las cepas mutantes RecA⁻, la recombinación puede tener lugar por el sistema de recombinación ilegítima propio de los elementos transponibles (el mecanismo sería el de la fusión de replicones, al que aludimos cuando estudiamos la transposición). En cualquiera de los dos casos, el plásmido integrado, es decir, el episoma, aparece "emparedado" entre dos copias de la IS implicada en la recombinación.

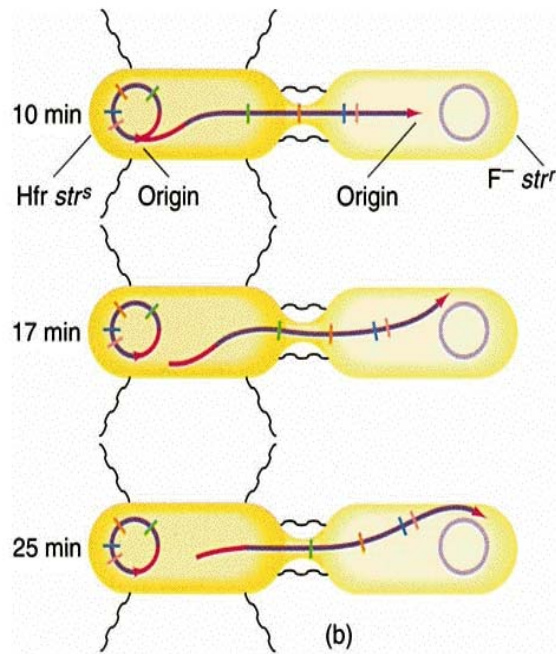


Cada recombinación origina una Hfr distinta, dependiendo de las secuencias IS implicadas, de su localización dentro del cromosoma de *E. coli*, y de la orientación. Ya dijimos que se han identificado unas 22 cepas Hfr distintas, y que existen ejemplos de parejas de Hfr que transfieren cromosoma a partir del mismo punto cromosómico, pero en orientaciones opuestas.



Recordemos de nuevo que las Hfr codifican todas las funciones del plásmido F. Al promover la transferencia conjugativa, "arrastran" al cromosoma desde el oriT. Para que se transfiriera todo el cromosoma, la pareja de cruce debería permanecer unida 100 minutos, y en ese caso, lo último que se transfiere es la porción del plásmido F que queda al otro lado de oriT (y que es la que lleva la región tra). Pero como dijimos, ello ocurre raramente (porque antes las parejas de cruce se deshacen espontáneamente), y por lo tanto, esta es la razón de que en los cruces Hfr×F⁻ los transconjugantes siguen siendo F⁻.

Así pues, en la mayor parte de los cruces HfrF×F⁻, lo que se transfiere (el exogenote) es un fragmento más o menos largo de ADN lineal del donador, encabezado por una parte del plásmido F y seguido por un trecho de cromosoma. Este fragmento no tiene capacidad de replicación autónoma, y su destino será perderse a no ser que se recombine con alguna porción homóloga del endogenote. Si ocurre esa recombinación, y suponiendo (como ocurre en los experimentos) que donador y receptor tienen marcadores distintos, nosotros detectamos eso precisamente por la alta frecuencia de recombinantes entre la población de transconjugantes receptores. No hace falta insistir (ya lo vimos en los experimentos de Jacob y Wollman) que para cada cepa Hfr existe un "gradiente" de marcadores transferidos, según su frecuencia final en los transconjugantes, que a su vez se correlaciona con el tiempo de entrada al receptor (siendo esto la base de la elaboración de mapas genéticos por conjugación).



3.2 REVERSIÓN DE LAS CEPAS Hfr, ORIGEN DE LAS F', Y SEXDUCCIÓN

La cepa Hfr puede revertir a F⁺, por una escisión precisa (exacta), que implica los extremos del factor integrado (las secuencias IS que lo "emparedan"). Cada cepa Hfr concreta presenta una frecuencia característica de reversión a F⁺. Algunas cepas son muy inestables, de modo que revierten frecuentemente, lo que obliga a purificarlas continuamente en el laboratorio para evitar que al final se obtenga una población F⁺. En cambio, otras cepas son muy estables. La cepa HfrC es la más estable, de modo que raramente revierte por escisión.

Pero también pueden ocurrir escisiones imprecisas (en las que están implicadas secuencias repetida diferentes a las IS que flanquean al episoma), de modo que el factor F adquiere trozos de genomio bacteriano adyacentes al lugar donde estaba integrado. Estos plásmidos F autónomos que adquieren e incorporan permanentemente un trozo de genomio bacteriano, se denominan F' (F'-primas). Dependiendo de qué se lleva en su escisión anómala se pueden distinguir:

1. Escisiones que dejan parte de F en el cromosoma pero que adquieren genes a uno u otro lado del sitio original de inserción: generan las F' de tipo I,
2. Escisiones que no dejan ninguna porción de F en el cromosoma bacteriano, pero que incorporan genes a ambos lados del sitio de inserción original: generan F' de tipo II.

A las cepas donde se genera originalmente cada F' concreto se las llama con el nombre de cepas F' primarias. Cada plásmido F' porta un segmento concreto y discreto de cromosoma, que dependiendo de la cepa puede tener una longitud de hasta el 25% del cromosoma bacteriano. Observen que una cepa F' primaria tiene una delección en su cromosoma, pero esa delección no es letal, porque el trozo de ADN escindido sigue en la célula, aunque formando parte ahora del F prima.

Si realizamos un cruce F' × F⁻, la célula receptora adquiere ese plásmido F', y por lo tanto, los genes bacterianos portados por dicho F'. Esta es la base del siguiente concepto:

3.3 SEXDUCCIÓN

La sexducción consiste en el transporte de material genético desde una célula a otra por medio de plásmidos F'. Sus caracteres distintivos respecto de los cruces F⁺ × F⁻ y de los Hfr × F⁻ son: a diferencia de los cruces F⁺ × F⁻, el plásmido F' transfiere regiones cromosómicas discretas a altas frecuencias (cercasas al 100%); pero a diferencia de los cruces Hfr × F⁻, el receptor se convierte en fértil.

Las cepas generadas por transferencia a ellas de un F' desde una cepa F' original se denominan F' secundarias. Tras la sexducción, si la cepa receptora es recA⁺, se produce una recombinación entre segmentos cromosómicos (procedentes de la célula donadora) portados por el F' y marcadores cromosómicos homólogos de esa cepa receptora. Se origina una cepa parecida a las Hfr (pero que no se ha producido por recombinaciones a través de las IS), que es merodiploide (diploide parcial) por recombinación, y no un recombinante por sustitución. Si se cura una cepa F' primaria de su plásmido F', obviamente quedará sin los genes cromosómicos que había "secuestrado" el factor F'. Si dichos genes eran esenciales para la viabilidad celular, el resultado es que la célula muere. Si no eran esenciales, se producirá la pérdida de funciones correspondientes, con la pertinente alteración del fenotipo. El uso de factores F'-primas fue muy útil durante muchos años para hacer análisis genéticos en bacterias (por ejemplo, muchos de los datos sobre el operón *lac* de *Escherichia coli* se obtuvieron con F'-primas, lo cual permitía realizar pruebas de complementación *cis-trans*). Sin embargo, actualmente, al igual que otras técnicas in vivo desarrolladas durante la "edad de oro de la genética molecular" (años 50-60), han sido prácticamente desplazadas por los métodos de Ingeniería Genética

4. ALGUNAS IDEAS ADICIONALES SOBRE BIOLOGÍA DE LOS PLÁSMIDOS

Vamos a concluir el presente capítulo con una rápida visión de algunos aspectos importantes de la biología de los plásmidos, deteniéndonos en algunos sistemas plasmídicos distintos al tipo del factor F que acabamos de estudiar.

4.1 TIPOS DE PLÁSMIDOS

Existe una amplia variedad de plásmidos. Los plásmidos bacterianos son de muchos tipos distintos, pero a grandes rasgos podemos clasificarlos atendiendo a diversos caracteres:

1. Según que sean autotransmisibles por conjugación o no:
 - a. plásmidos conjugativos
 - b. plásmidos no-conjugativos. Dentro de esta categoría se incluyen:
 - i. plásmidos no movilizables
 - ii. plásmidos movilizables por otros que sí son conjugativos.
2. Según su control de replicación vegetativa:
 - a. Plásmidos de control estricto del número de copias: tienen bajo número de copias por cromosoma en la misma célula. Suelen ser plásmidos de tamaños medianos (unas 30 kb) a grandes (cientos de kb). P. ej., el factor F se mantiene a 1-2 copias por cromosoma.
 - b. Plásmidos de control relajado: alto n° de copias por cromosoma (más de 10). Suelen ser plásmidos pequeños (menos de 10 kb). Algunos de ellos tienen un sistema de replicación especial, y son amplificables cuando a las bacterias que los poseen se les añade cloramfenicol: este antibiótico detiene la síntesis de proteínas, lo que afecta a la replicación del cromosoma, ya que para que se inicie cada ciclo de replicación cromosómica se necesita un nuevo "pool" de determinadas enzimas. Pero esto no afecta a la replicación del plásmido, que de este manera se "amplifica" y aumenta aún más su proporción respecto del cromosoma.
3. Según el tipo de fenotipos que codifican (y dejando aparte a los plásmidos crípticos, de los que se desconoce su función fenotípica):
 - a. Plásmidos R, que codifican una o más resistencias a drogas (antibióticos) y/o resistencia a metales pesados.
 - b. Plásmidos bacteriocinogénicos, que codifican alguna bacteriocina y simultáneamente confieren inmunidad frente a esa bacteriocina a la bacteria que lo posee. Dentro de ellos, de los más estudiados son los plásmidos Col, que producen colicinas (bacteriocinas de *E. coli*).
 - c. Plásmidos de virulencia, que codifican funciones relacionadas con la virulencia en muchas bacterias patógenas. Por ejemplo:
 - i. plásmido de la toxina tetánica en *Clostridium tetani*.
 - ii. plásmido de la toxina del ántrax en *Bacillus anthracis*.
 - d. Plásmidos que codifican factores de colonización (para la invasión de los tejidos de su hospedador).
 - e. Plásmidos de cepas de *Pseudomonas*, que confieren rutas metabólicas capaces de utilizar como fuentes de carbono y energía sustancias que otros organismos no pueden catabolizar:
 - i. plásmidos OCT (degradación del octano);
 - ii. plásmidos TOL/XYL (degradación del tolueno y xileno);
 - iii. plásmidos NAF (degradación del naftaleno), etc.
 - f. Plásmidos de cepas de *Rhizobium* responsables de funciones relacionadas con el establecimiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno en los nódulos radicales de las leguminosas (pSym y otros tipos).
 - g. Plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium*, responsables de la producción de tumores en numerosas plantas dicotiledóneas.

- h. Existen igualmente plásmidos que codifican más de un tipo de fenotipos: p. ej., plásmidos que suministran resistencia a antibióticos y capacidad de virulencia.
4. Plásmidos según el grupo de incompatibilidad. Recordar la definición de incompatibilidad entre plásmidos que se dio oportunamente, y la base de este fenómeno: dos plásmidos son incompatibles (no pueden permanecer establemente en la misma célula) porque comparten un mismo sistema de replicación y segregación de las copias. Como se sabe, los plásmidos se pueden clasificar según su pertenencia a un mismo grupo de incompatibilidad.
- Así p. ej., el plásmido F pertenece al llamado grupo IncFI;
 - Los plásmidos R1 y R100, de resistencia a antibióticos, pertenecen al grupo IncFII.
- Obsérvese que dos plásmidos conjugativos pertenecientes a grupos de incompatibilidad diferentes pueden poseer regiones tra semejantes, y tipos de pelos sexuales parecidos. Esto es precisamente lo que ocurre con el F comparado con el R1 o el R100.

4.2 MÁS IDEAS ACERCA DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

En Gram negativas existe una muy amplia variedad de plásmidos. Podemos encontrar ejemplos de plásmidos conjugativos, aunque no todos basados en el sistema que hemos estudiado para el factor F. Muchos plásmidos conjugativos poseen pelos de tipo F (por ej., los ya citados R1 y R100), pero existen otros tipos de sistemas, con sus correspondientes clases de pelos sexuales. p. ej., el plásmido colicinogénico ColE1 posee pelos de tipo "I".

Existen muchos casos de plásmidos no conjugativos, pero algunos de ellos pueden ser transferidos a cepas receptoras cuando "conviven" en la célula donadora con otro plásmido conjugativo capaz de movilizarlos. Ello suele deberse a que estos plásmidos no autotransmisibles pero movilizables carecen de la región tra, pero poseen una región denominada mob (del inglés "mobilizable"), que es reconocida por proteínas Tra de conjugación suministradas in trans por el plásmido movilizador, aunque la región mob del plásmido movilizable suministra una región in cis (la secuencia oriT) y un par de funciones in trans (la endonucleasa específica que actúa sobre oriT, y una helicasa).

En algunas bacterias Gram negativas, p. ej., en cepas de *Pseudomonas* existe un tipo especial de plásmido conjugativo, que tiene la facultad de transferirse a sí mismo y transferir cromosoma entre una amplia variedad de bacterias Gram negativas, incluyendo entre géneros muy diferentes. A esta clase de plásmidos se le ha dado el nombre de plásmidos promiscuos, y se han usado mucho para realizar mapeos y análisis genéticos en bacterias que por sí mismas carecen de sistemas naturales de conjugación. Ejemplos:

determinados plásmidos de resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo IncP1 (como el RP4 y el R68.45, ambos con el fenotipo Ampr, Kanr, Tetr).

plásmidos del grupo IncW (como el R388).

plásmidos del grupo IncN (como el pKM101)

La existencia de plásmidos conjugativos, promiscuos o no, y de plásmidos no conjugativos pero movilizables, explica la rápida diseminación de muchos plásmidos de resistencia a antibióticos a una amplia diversidad de bacterias, incluyendo importantes patógenas, lo que hace cada vez más difícil la lucha por quimioterapia contra estas últimas. De hecho, un importante problema sanitario lo suministran estas cepas multirresistentes, muchas de las cuales están "acantonadas" en los ambientes hospitalarios, donde la presión selectiva es grande. A continuación nos detendremos precisamente en un comentario sobre los plásmidos R, su significado evolutivo y su importancia epidemiológica.

5.3 PLÁSMIDOS R

Los plásmidos de resistencia a antibióticos (plásmidos R) fueron descubiertos en los años 50 en Japón, cuando se investigaban cepas de *Shigella* multirresistentes (Cmr, Smr, Sur, Tetr) que habían empezado a aparecer y proliferar, de modo que en pocos años se diseminaron rápidamente por todo el primer mundo. Enseguida se encontraron en numerosos países cepas de *E. coli* y de otras enterobacterias con plásmidos similares.

Del intenso estudio a que han estado sometidos estos plásmidos desde entonces se deduce que los plásmidos R son "maleables" y que evolucionan rápidamente ante la presión selectiva. Con las modernas técnicas de Ingeniería Genética y de secuenciación de ADN ha sido posible medir el grado de similitud de los genes plasmídicos de resistencia a antibióticos procedentes de bacterias muy diferentes, y de orígenes geográficos muy alejados entre sí, deduciéndose que estos genes han debido de "pasar" de forma epidémica de unas cepas a otras, entre especies y géneros muy distintos ("transmisión horizontal" de información genética). Un mismo gen, conservado en su secuencia en especies muy alejadas, puede sin embargo estar situado en plásmidos de diferentes tipos y grupos de incompatibilidad. Esto ya es un indicio de que los plásmidos R son bastante "moldeables", y que han venido evolucionando rápidamente desde que el hombre introdujo los quimioterápicos a mediados de este siglo.

Consecuencias evolutivas y epidemiológicas: Aunque en la naturaleza, e independientemente de la acción humana, ya existían plásmidos R antes de la era de los antibióticos, está claro que desde el uso masivo de los quimioterápicos se ha originado un aumento espectacular del número de cepas bacterianas portadoras de plásmidos R, así como el hecho de que los R que se están aislando recientemente llevan mayor número de genes de resistencia, lo que está dificultando los tratamientos de ciertas enfermedades infecciosas.

Estamos ante un espectacular "experimento" de genética de poblaciones, en el que la acción humana ha llevado a la supervivencia y prevalencia de las cepas bacterianas más aptas, por adaptación evolutiva frente a una fuerte presión selectiva. Para ilustrar esto, basta hacer una sencilla comprobación: si se trata a un paciente con tetraciclina, al cabo de una semana las cepas de *E. coli* que se aislen de sus heces serán casi en su totalidad Tetr.

Está claro que la prescripción y uso indiscriminado de antibióticos como terapia provoca una presión selectiva que favorece la prevalencia de cepas portadoras de plásmidos R, que van "incorporando" genes de resistencia a diversos quimioterápicos. El uso de un antibiótico provoca la selección automática de las demás resistencias a otros antibióticos, ya que los genes responsables respectivos forman parte del mismo replicón, que además, al ser en muchos casos de tipo conjugativo, puede diseminarse a otras cepas de la misma o de diferentes especies.

En muchos países se usan antibióticos como suplementos de dieta para los animales domésticos. Se ha comprobado que esto es también una fuente de transmisión de cepas resistentes a humanos.

Otra cuestión evolutiva, aún no resuelta, es la del origen último de los genes de resistencia que tan fácilmente parecen transferirse entre especies bacterianas. Una hipótesis es que proceden de bacterias del suelo del grupo de los Actinomicetos, sobre todo del género *Streptomyces*, que son típicos productores de antibióticos, y que poseen de modo natural mecanismos de resistencia para evitar que el antibiótico que producen les afecte negativamente.

4.5 TRANSFERENCIA CONJUGATIVA ENTRE REINOS

Un sorprendente sistema de intercambio de material genético nada menos que entre una bacteria y plantas superiores lo tenemos en el caso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que parasita una amplia diversidad de plantas dicotiledóneas. Como el estudiante verá en la sección de Taxonomía bacteriana, esta bacteria provoca el llamado "tumor en agalla" en los tallos de muchas plantas, debido a que posee un plásmido llamado Ti (iniciales inglesas de "inducción de tumoración (=agalla en corona)". Los productos de ciertos genes del plásmido Ti detectan la presencia de la planta, y activan a los genes tra, que promueven la transferencia a la célula vegetal de un segmento del plásmido denominado ADN-T. Dicho ADN-T se integra en el genoma vegetal, y allí los genes que lleva, que son de tipo eucariótico, obligan a la planta a fabricar hormonas vegetales (responsables del crecimiento incontrolado de las células de la planta) y a fabricar unas sustancias (las opinas) que sólo puede usar la bacteria como fuente de C y energía. Estamos ante un extraordinario caso de "colonización genética" de una bacteria sobre un organismo superior.

Los humanos hemos aprendido, a nuestra vez, a "domesticar" el sistema del plásmido Ti, de modo que actualmente, a partir de él se puede realizar Ingeniería Genética de plantas. La mayor parte de las plantas transgénicas están obtenidas con algún sistema de plásmidos artificiales derivados de Ti, que funcionan como vectores para introducir genes foráneos en una amplia diversidad de especies vegetales.

Tomado de: Curso de Microbiología General (Enrique Iañez)
<http://www.ugr.es/local/eianez>
<http://www.ugr.es/local/eianez>

PERIODOS EXPERIMENTALES: PRACTICA 5

OBJETIVOS

Adiestrar al estudiante en la correcta manipulación de los instrumentos y equipos utilizados en un laboratorio de genética.
Ejercitar al estudiante en la manipulación de bacterias bajo condiciones asépticas para estudios genéticos.
Poner en evidencia los cambios fenotípicos ocurridos como consecuencia de la transferencia de marcadores genéticos de una cepa a otra mediante conjugación bacteriana.
Determinar el título de cultivos bacterianos y la tasa de reversión fenotípica de mutantes auxotróficos.
Ejercitarse en la construcción de un mapa genético de *E. coli* a partir de la estimación de un gradiente de transferencia.

1er Período: Preparación del material biológico.

1) **Reactivación de cepas.** A partir de los tacos y cuñas conservados en el cepario, reactive las cepas OEG 322 y CSH36 (donantes) y la cepa OEG356 (receptora). Verifique el genotipo y fenotipo de estas cepas en la tabla de la guía de prácticas. Utilice los medios de cultivo agarizados adecuados, tomando en cuenta los requerimientos nutricionales así como las resistencias a antibióticos.

2) **Preparación de los preinóculos.** A partir de las colonias reaisladas en el paso anterior, inocule un tubo conteniendo ML con el correspondiente antibiótico (en caso de ser necesario). Incube a 37°C toda la noche.

2o Período: Conjugación bacteriana.

1) **Experimentos de conjugación.** A partir de los preinóculos crecidos toda la noche, inocule sendas fiolas conteniendo 50 ml de ML y el correspondiente antibiótico. Incube con agitación a 37°C por 6 horas. Diluya 1/20 la cepa donante (322 ó CSH36) y 1/10 la cepa receptora (356) con ML, para un volumen final de 10 ml, en un tubo de ensayo estéril. Incube a 37°C por 90 min sin agitación. Al finalizar la incubación, agite bien con un vórtex y centrifugue a 4000 RPM por 10 min (OJO: balancee muy bien los tubos para no dañar el rotor de la centrifuga!). Resuspenda el pellet bacteriano en 1 ml de sales 1× y siembre 0.1 ml de las diluciones correspondientes en placas de medio selectivo (ver más abajo).

2) **Experimentos control.** Someta cada una de las tres cepas por separado al mismo tratamiento descrito en el paso anterior. Al finalizar la incubación calcule el título de cada cepa sembrando diluciones seriadas de las mismas en ML. De igual forma, verifique la tasa de reversión sembrando las cepas en los respectivos MMs.

3er Período: Estudio de la frecuencia de transferencia de dos marcadores.

Si un marcador genético es transferido por una cepa Hfr dentro de los primeros 30 minutos de transferencia, se puede realizar un cruce seleccionando para este marcador y luego estimando las frecuencias de co-transferencia de otros marcadores conocidos. Con los datos obtenidos se construye un gráfico que relaciona la distancia (en minutos) con la frecuencia de co-transferencia de los demás marcadores (gradiente de transferencia). A partir de este gráfico se puede estimar la distancia de un marcador desconocido y construir un mapa genético del cromosoma bacteriano.

1) Observe la aparición de colonias de exconjugantes (recombinantes) en cada uno de los diferentes MM. Cuente el número de colonias para cada marcador genético y anote estos valores en la tabla anexa. Calcule la frecuencia de aparición de recombinantes. Para ello determine primero el título de la receptora (**A**) y el título de los exconjugantes (**B**). La frecuencia de recombinantes se calcula según la fórmula $FR = B/A$ y se expresa en notación científica (el porcentaje de recombinantes para cada marcador se calcula multiplicando este valor por 100).

Anote los resultados observados en la siguiente Tabla. No olvide anotar el factor de dilución en cada caso. En la fila de la izquierda anote el número de colonias por placa y en la de la derecha la frecuencia de recombinantes para cada marcador.

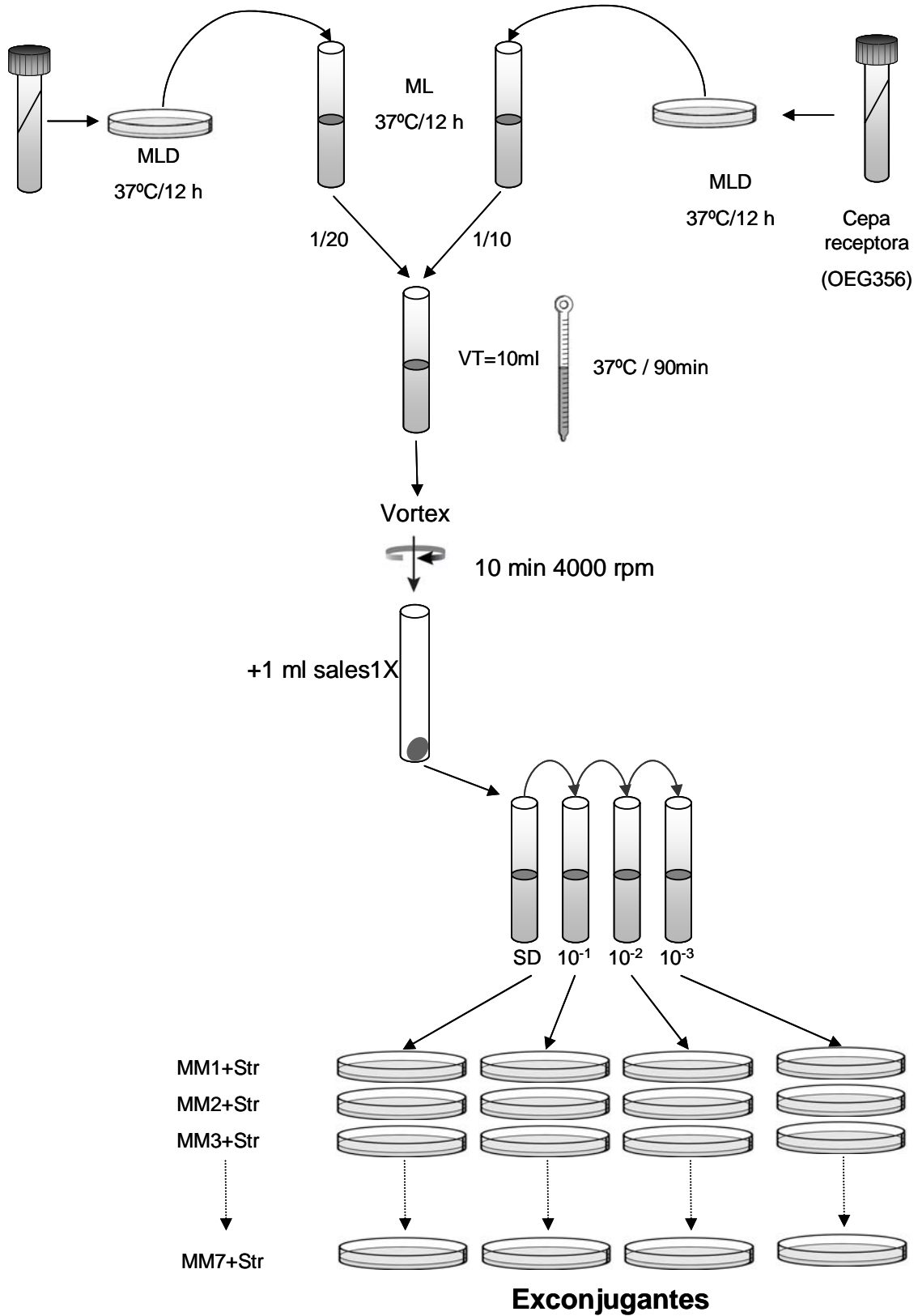
Cruce Medio	322 x 356 (Hfr × F ⁻)		CSH36 x 356 (F ⁺ × F ⁻)		CSH36 (F ⁺)		356 (Hfr)	
MM-His (His ⁺)								
MM-Pro (Pro ⁺)								
MM-Arg (Arg ⁺)								
MM-Leu (Leu ⁺)								
MM+Gal (Gal ⁺)								
MM+Lac (Lac ⁺)								

- 2) Con la ayuda de palillos estériles, transfiera 100 colonias recombinantes (de un solo tipo) a una placa conteniendo el mismo MM de donde provienen las colonias (no olvide el antibiótico!). Utilice una plantilla para ubicar la posición de cada uno de los clones transferidos. Incube a 37°C toda la noche.
- 3) Repique cada uno de los 100 clones a placas de MM, cada una de las cuales carece de un requerimiento nutricional. Incube a 37°C.
- 4) Observe el crecimiento en cada una de las placas, cuente el porcentaje de exconjugantes que adquirieron los dos marcadores simultáneamente. Anote estos valores en la tabla correspondiente.
- 5) Calcule las distancias que separan a los diferentes marcadores en base a la construcción de una gráfica en papel semilog. Su profesor le indicará las distancias de cada marcador en el mapa genético de *E. coli*.

EJERCICIO: Se realizó un experimento de conjugación interrumpida entre una cepa Hfr y una cepa F⁻. Los resultados obtenidos se señalan en la Tabla anexa. En base a la información presentada (tiempo de aparición de los diferentes recombinantes y frecuencias de co-transferencia), calcule la ubicación de los marcadores *chlE* y *purB* en relación con los demás marcadores genéticos. Dibuje además un esquema del mapa genético de *E. coli* señalando la localización de todos los marcadores genéticos

Marcador	Tiempo (min)	% Recombinantes
<i>His</i>	0	100
<i>trpA</i>	17	89
<i>thr</i>	44	64
<i>malK</i>	54	40
<i>malT</i>	69	21
<i>argG</i>	76	8
<i>chlE</i>	¿?	36
<i>purB</i>	¿?	24

CONJUGACIÓN BACTERIANA



TRANSDUCCIÓN

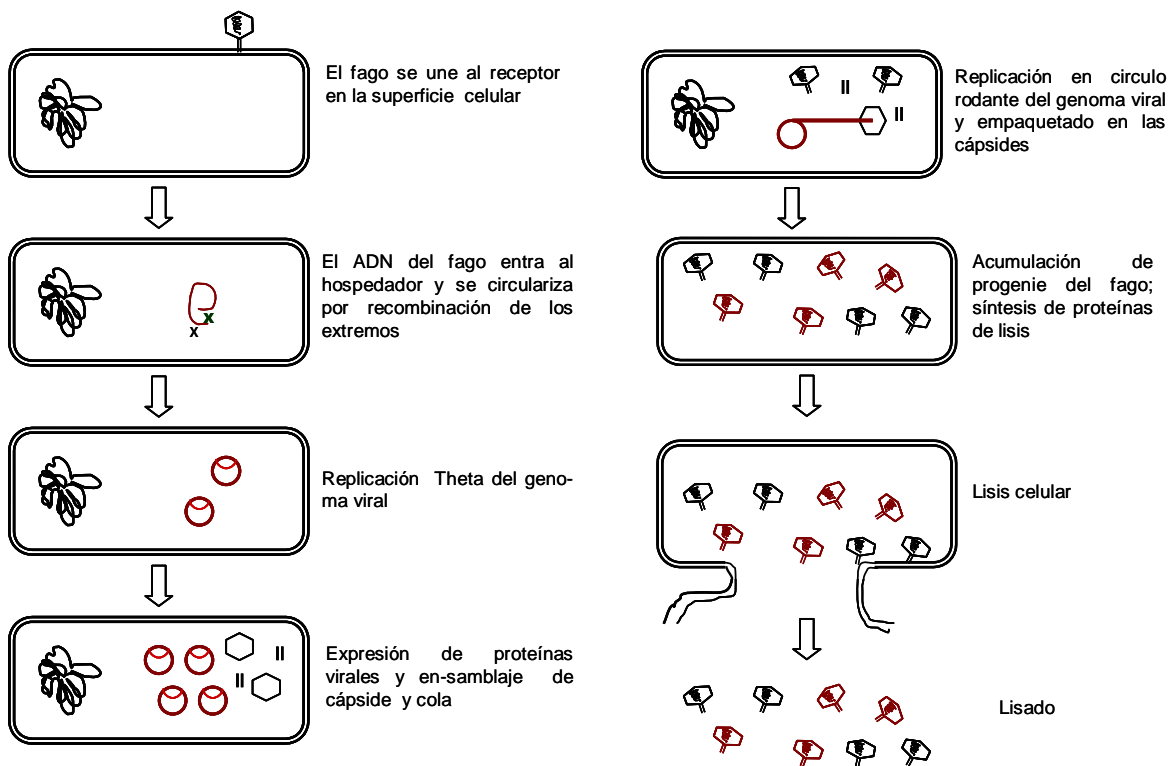
1. PREÁMBULO: AVANCE DE CONCEPTOS SOBRE BACTERIÓFAGOS

Antes de entrar de lleno en el tema de la transducción, conviene que adelantemos algunas ideas generales sobre los virus bacterianos con genoma de ADN, que nos serán útiles para el presente capítulo (ver esquema más abajo).

El proceso de la infección comienza cuando la partícula del fago se adsorbe sobre receptores en la superficie de la bacteria. Luego, el fago inyecta el ADN contenido en su cápside que entra en la célula hospedadora. Este ADN tenderá a expresar su programa genético, pero el resultado final dependerá de que el fago sea de tipo virulento o de tipo moderado:

A. Si el fago es de tipo virulento:

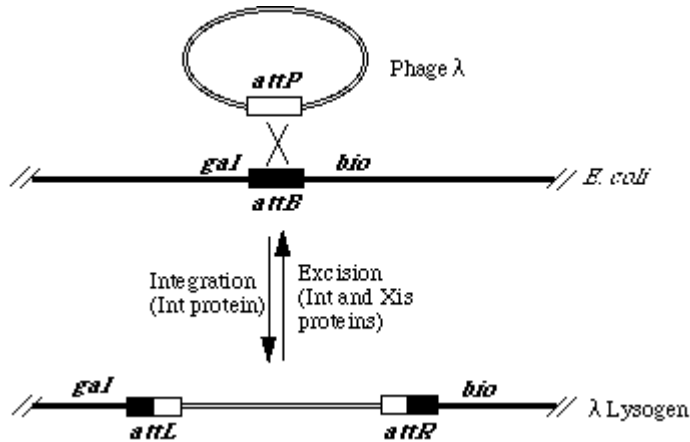
Se expresa el programa genético vegetativo (lítico) de su genoma, destinado a producir muchas copias de ese ADN fágico, y muchas cápsides proteicas. En el interior de cada cápside se introduce ("se empaqueta") una copia del genoma del fago. Las nuevas partículas (viriones), una vez completadas y ensambladas, lisan a la bacteria, quedando libres en el medio y preparadas para infectar nuevas células de la especie bacteriana hospedadora.



B. Si el fago es de tipo moderado pueden darse dos alternativas distintas:

b.1) El ADN inyectado expresa su información vegetativa, de modo que se produce un ciclo lítico, productivo de nuevos viriones, similar al descrito para los fagos virulentos; o bien

b.2) Se pueden reprimir las funciones líticas del fago. En este caso el ADN del fago establece una relación benigna con su hospedador: suele incorporarse por recombinación específica de sitio conservativa, integrándose en el cromosoma bacteriano. A partir de este momento, el ADN del fago (que ahora se llama profago) permanece en esta situación, como una porción más del genoma de la bacteria, replicándose como parte de éste.



El profago mantiene reprimidas todas sus funciones líticas (vegetativas), expresando solamente una proteína represora de aquellas funciones (todo esto lo verá en detalle en el curso teórico de Genética I). La célula bacteriana portadora de un profago se denomina lisogénica, y el clon derivado de ella, clon lisogénico. Este tipo de relación benigna es estable, pero de forma

espontánea, en algunas de las células del clon lisogénico el profago "despierta" y se activan sus funciones vegetativas: el profago se escinde del genoma bacteriano (de nuevo por recombinación específica) y expresa su programa lítico, que conduce a la producción de nuevos viriones, con lisis de la bacteria. Este fenómeno recibe el nombre de inducción. Artificialmente se puede provocar la inducción de casi todo el cultivo lisogénico, tratándolo con determinados agentes (luz UV, mitomicina, etc.) que dañan el ADN y que inducen el sistema SOS.

2. APROXIMACIÓN HISTÓRICA Y CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA TRANSDUCCIÓN

La transducción fue cronológicamente el último sistema de transferencia genética bacteriana que se descubrió. En 1951 Joshua Lederberg y su colaborador Zinder estaban investigando en *Salmonella* la posible existencia de un sistema de conjugación al estilo del que se acababa de descubrir en su pariente *Escherichia coli*. Mezclaron dos cepas de *Salmonella*, cada una con un juego distinto de marcadores genéticos. Eureka! Obtuvieron recombinantes. Descartaron que se tratara de transformación, ya que los resultados eran similares si añadían DNasa al sistema. Entonces, ¿era un fenómeno de conjugación? Realizaron el experimento del tubo en "U", con una membrana separando los dos brazos de la U, en cada uno de los cuales se colocaba una de las cepas. La membrana impide el paso de bacterias y los contactos intercelulares directos entre las dos cepas. Pues bien... seguía habiendo recombinantes. Esto descartaba, pues, que se tratara de conjugación. Se postuló que debía de existir un "agente filtrable" resistente a las nucleasas, responsable último de la transferencia genética.

¿Cuál era la naturaleza exacta del misterioso agente filtrable? Por experimentos independientes se sabía que una de las dos cepas de *Salmonella* producía un fago (llamado P22), de tipo moderado. Con una serie de ensayos se demostró que era precisamente este fago el responsable de los recombinantes:

el tratamiento de sobrenadantes de esa cepa con calor o con antisuero provocaba la inactivación tanto del fago como del agente filtrable;

las cepas de *Salmonella* resistentes a P22 (porque no adsorben el fago) no pueden interactuar con el agente filtrable, y por lo tanto tampoco dan recombinantes;

finalmente, se comprobó que la cepa productora del agente filtrable poseía un fago moderado en forma de profago. La inducción de esta cepa lisogénica era la responsable de producir algunas partículas de fagos portadoras de material genético de la cepa de origen, que los fagos inyectaban posteriormente a las células de la cepa receptora.

Así pues, se acababa de descubrir un nuevo sistema de transferencia genética entre bacterias, sistema que fue bautizado con el nombre de transducción.

La transducción se puede definir como el proceso de transferencia genética desde una célula donadora a otra receptora mediatizado por partículas de bacteriófagos que contienen ADN genómico de la primera. En la transducción podemos distinguir dos etapas diferenciadas:

1. Formación de la partícula fágica transductora: un trozo de material genético de la célula donadora se introduce en el interior de la cabeza de la cápsida de un fago. Las partículas transductoras son en cierta manera "subproductos" anómalos del ciclo normal del fago.

2. La partícula transductora inyecta de forma habitual el ADN que porta a la célula receptora, donde este ADN puede eventualmente recombinarse y expresar su información.

La transducción descubierta por Lederberg y Zinder se llama transducción generalizada. Mediante ella se puede transferir cualquier marcador del genoma del donador, con aproximadamente la misma frecuencia relativa (de ahí el calificativo de generalizada).

La transducción generalizada se produce sólo como consecuencia de infecciones líticas.

El ADN del genoma de la bacteria donadora que es introducido en la partícula transductora suele ir sin acompañamiento de ADN del propio fago. Por ello, a esta peculiar partícula consistente en cápsida del fago que encierra ADN genómico de la bacteria se la denomina pseudovirión.

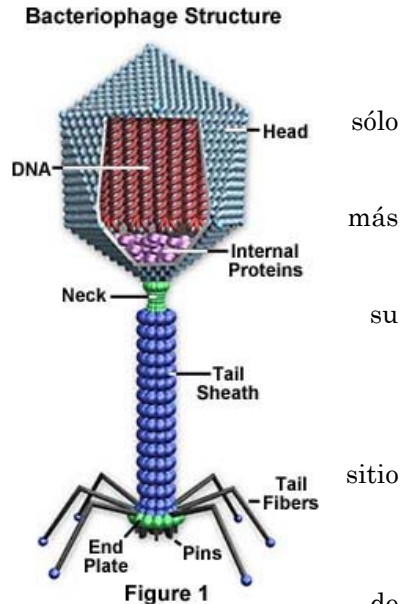
Siguiendo con la buena racha de descubrimientos, pocos años tarde (1956), el mismo Lederberg (esta vez junto con su mujer, y con Morse) hallaron un tipo nuevo de transducción, mientras estaban estudiando el sistema del fago moderado λ y hospedador, *E. coli*. Este tipo de transducción recibió el nombre de transducción especializada, y sus caracteres distintivos son:

a) sólo se transfieren marcadores cromosómicos cercanos al de integración del ADN del fago (profago) en la célula lisogénica (p. ej., en el caso de λ , los marcadores gal o bio);

b) se produce únicamente como consecuencia de la inducción de la célula lisogénica por escisión del profago y consiguiente entrada a fase lítica, productora de nuevas partículas de fago;

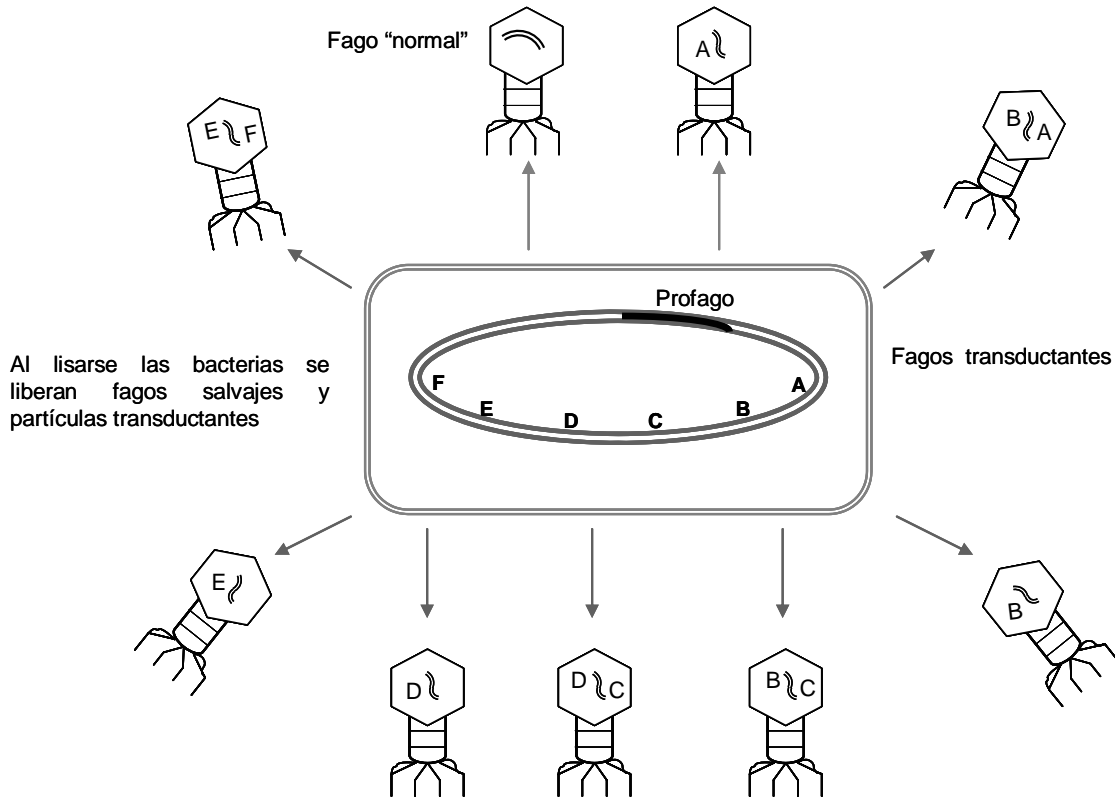
c) el ADN genómico de la bacteria transportado por la partícula transductora va unido a ADN del fago;

d) la célula transductante se suele convertir en lisogénica para el fago correspondiente.



3. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA

Se caracteriza porque en ella se puede transferir cualquier trozo del genoma bacteriano, con tal de que tenga un tamaño compatible con la capacidad de "empaquetado" de ADN de la cápsida del fago. La partícula transductora (pseudovirión) se forma por empaquetamiento anómalo de ADN genómico bacteriano. En el interior de la cabeza del pseudovirión sólo existe ADN bacteriano, sin ADN del fago. Las partículas transductoras sólo se forman como consecuencia de infecciones líticas del fago.



Mecanismo de la transducción generalizada promovida por el fago P22 de *S. typhimurium*.

1ª fase: producción de las partículas fágicas transductoras (=pseudoviriones) por encapsidamiento ilegítimo de ADN cromosómico. De vez en cuando, el sistema fágico encargado de introducir su ADN en la cápsida (sistema pac), se "equivoca", y en su lugar introduce un trozo de tamaño equivalente del genoma de la bacteria donde está teniendo lugar la infección.

Al parecer, el cromosoma bacteriano contiene secuencias que eventualmente pueden ser reconocidas de vez en cuando por el sistema del fago, de manera que puede introducirse un trozo de ADN de *Salmonella* en la cápsida.

Al final de esta fase, la célula hospedadora se lisa. El lisado (sobrenadante) contiene una mayoría de viriones auténticos y un pequeño número de pseudoviriones, cada uno con un trozo aleatorio distinto del genoma de la bacteria.

2ª fase: Destino del ADN del exogenote: si mezclamos el lisado obtenido en la fase anterior con un cultivo de una cepa receptora (dotada de marcadores genéticos adecuados), cada

pseudovirión inyecta de forma normal su ADN a una bacteria. Este ADN puede tener varios destinos posibles:

- 1) Puede ser destruido por exo- y endonucleasas citoplásmicas.
- 2) Puede recombinarse con la región homóloga del genoma del receptor, mediante la actuación del sistema de recombinación general dependiente de RecA. Se produce una recombinación con dos sobrecruzamientos ("crossing-overs"), que conduce a la integración de doble cadena de ese exogenote, con eliminación de la zona homóloga del endogenote.
- 3) Puede ocurrir que el exogenote no sea ni destruido ni recombinado; este ADN puede persistir en la célula sin replicarse. La consecuencia de esto es que cuando la célula que originalmente recibió ese ADN exógeno se divide, lo pasará solo a una de las dos células hijas, la cual a su vez la pasará a una hija en la siguiente división, y así sucesivamente. Tenemos, pues, que el exogenote se va diluyendo en el clon por transmisión unilinear: tras varias generaciones, el clon consta de $n-1$ células sin exogenote y una sola célula con ese exogenote. A este fenómeno se le conoce con el nombre de transducción abortiva, y es más frecuente que la transducción completa derivada de recombinación (más de 90% frente a sólo 1-5%).

La célula que alberga el exogenote abortivo puede expresar los genes de éste: por lo tanto, la célula transductante abortiva contiene proteínas derivadas del exogenote. Parte de las proteínas (en principio la mitad), pasarán a la célula hija que no reciba el exogenote en la siguiente generación. Las hijas de la hija ("las nietas no herederas del original") reciben la cuarta parte, etc... es decir, aparte de la célula hija que en cada generación hereda el exogenote, sus parientes no-herederos más cercanos reciben proteínas derivadas de la expresión previa de los genes del exogenote. Esto significa que las células no herederas pueden poseer, durante unas pocas generaciones, la función o funciones del exogenote, hasta que el producto correspondiente se diluya o se inactive.

Esto permite detectar fácilmente determinados tipos de transductantes abortivos, distinguiéndolos de los transductantes completos. Por ejemplo, si estamos seleccionando transductantes en base a la adquisición, por parte de una cepa receptora auxótrofa, de la versión silvestre del gen que tiene mutado, sembrando en placas de Petri con medio mínimo, se distinguen dos tipos de colonias:

colonias grandes, correspondientes a transductantes completos;
microcolonias, correspondientes a los transductantes abortivos.

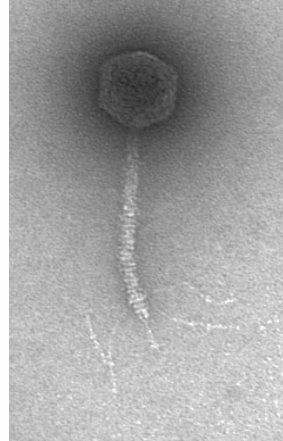
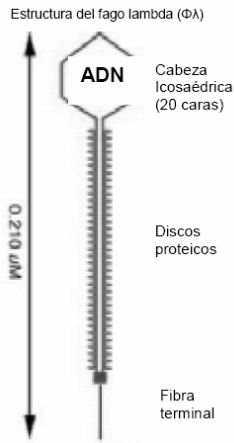
- 4) Si el exogenote es un plásmido, al llegar a la célula receptora, puede replicarse autónomamente.
- 5) Si el exogenote contiene un transposón (elemento genético que puede pasar de un replicón a otro), éste puede insertarse en el genoma de la célula receptora.

No todos los fagos virulentos pueden actuar como mediadores de transducción generalizada. Los fagos con esta capacidad suelen ser aquellos que no degradan totalmente el ADN del hospedador inmediatamente después de entrar (de otra manera, no habría ADN intacto que transducir). Además, su sistema de empaquetamiento de ADN no debe ser muy específico: fagos como el P22 de *Salmonella typhimurium* o el P1 de *Escherichia coli* tienen un mecanismo de empaquetado secuencial de unidades de concatémeros, mecanismo que reconoce secuencias que también existen con cierta frecuencia en el genoma del hospedador.

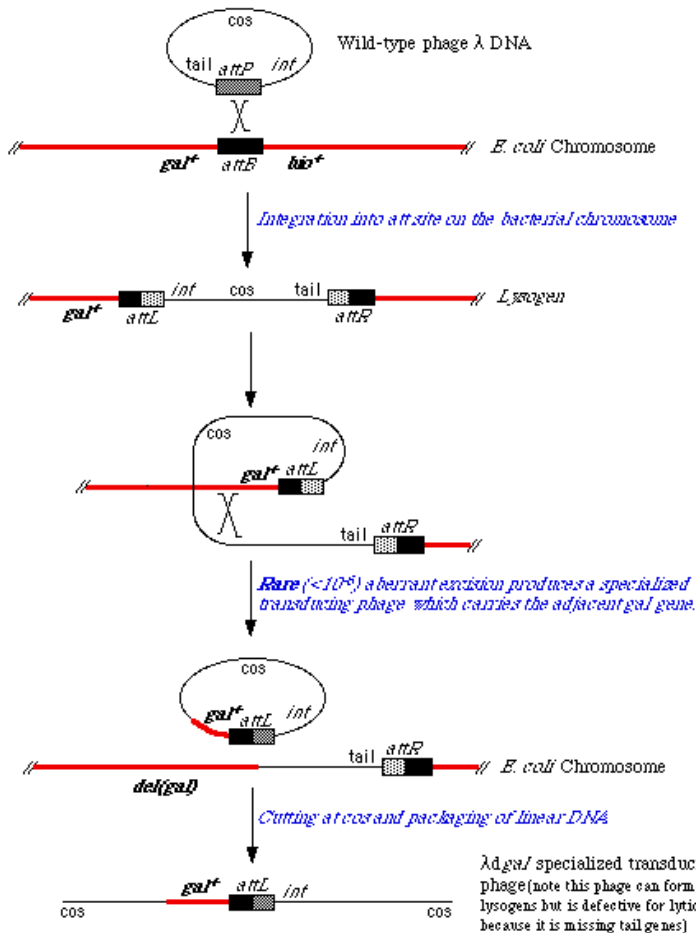
La transducción generalizada ha sido muy útil en el análisis genético de bacterias y la construcción de nuevas cepas. Los alumnos estudiarán en la asignatura de Genética algunas aplicaciones, incluida la elaboración de mapas de ligamiento.

4. TRANSDUCCIÓN ESPECIALIZADA (=RESTRINGIDA)

Recordemos que fue descubierta por el equipo de Lederberg (1956), mientras hacían experimentos de inducción de células de *E. coli* lisogenizadas con el fago λ . Este tipo de transducción consiste en la transferencia (mediatizada por fagos moderados producidos en la inducción de un cultivo lisogénico), de un número limitado de marcadores, correspondientes a los *loci* genéticos adyacentes al sitio de integración del profago. La transducción restringida nunca ocurre por infecciones líticas. El ADN transducido va unido a ADN del fago.



Mecanismo de la transducción especializada promovida por el fago λ de *Escherichia coli*



1ª fase: Producción de los fagos transductores: Supongamos una cepa silvestre de *E. coli* K12 (λ^+), o sea, lisogénica para el fago λ . Como ya sabemos, el profago se encuentra integrado entre los operones *gal* y *bio*.

Inducimos artificialmente este cultivo lisogénico (tratando, p. ej., con rayos UV, o con mitomicina-C). El profago desreprime sus funciones vegetativas, de modo que va a entrar en un ciclo lítico, comenzando por escindirse del lugar de integración, por medio de una recombinación específica conservativa entre sus extremos (BOP' \times POB'). Con una baja frecuencia (10^{-5} - 10^{-6}) se producen escisiones anómalas del profago: bucles anómalos, de modo que se forman círculos que llevan una porción adyacente del

cromosoma bacteriano (dependiendo de los casos, o *gal* o *bio*), y en cambio, queda un trozo del genoma del fago. De esta forma se pueden formar fagos λ defectivos (λ_d) para alguna función fágica, pero con la "contrapartida" de ser portadores de material genómico de la bacteria hospedadora.

Así pues, de esta forma se obtiene un lisado (llamado lisado LTF, de baja frecuencia de transducción), donde existe una pequeña proporción (alrededor de 10^{-6}) de partículas defectivas del fago portadoras de ADN cromosómico. Estos viriones, por sí solos no podrían establecer lisogenia, pero si en una misma célula inyectaran su ADN un fago defectivo y otro silvestre, este último actuaría como fago auxiliador ("helper") de modo que el defectivo sí podría entonces establecer lisogenia. A continuación veremos precisamente cada una de estas dos posibilidades. (En ambos casos vamos a suponer que las partículas transductoras portan el operón silvestre gal^+ , y que empleamos una cepa receptora mutante gal^-).

2ª fase (en el caso de infectar una cepa receptora con el lisado anterior a baja multiplicidad de infección): Imaginemos que mezclamos un cultivo de la cepa receptora con un lisado LTF, a una multiplicidad de infección (m.d.i., o en inglés, m.o.i) de alrededor de 1 (o sea, cada bacteria recibe, por término medio una sola partícula de fago).

Una partícula λ_{gal^+} inyectaría de forma normal su ADN en la bacteria gal^- . El ADN lineal del fago se circulariza como de costumbre. Pero obsérvese que este ADN no posee un sitio *att* normal, sino que presenta solamente el sitio BOP' (derivado de la escisión anómala producida en el ciclo anterior), y además, al ser defectivo, cabe la posibilidad de que haya perdido el gen *int* que codifica la integrasa. En este caso, la única posibilidad de integración del ADN es mediante recombinación homóloga simple (un solo crossing-over) propiciada por el sistema RecA de la bacteria receptora.

El resultado de esta recombinación homóloga es la creación de un heterogenote gal^+/gal^- con un profago λ defectivo, que debido a ese carácter defectivo no es inducible (no provoca lisogenia). Observar que cada copia del gen *gal* es en realidad un "mosaico", con una porción derivada del exogenote y otra del endogenote. Este heterogenote con fenotipo Gal^+ es estable.

2ª fase (en el caso de infectar la cepa receptora con el lisado LTF a una alta multiplicidad de infección): Imaginemos ahora que mezclamos una media de 10 partículas de fago del lisado obtenido en la primera fase con 1 célula de la bacteria receptora (o sea, una m.o.i.=10).

Algunas bacterias reciben el ADN del fago defectivo ($\lambda_d gal^+$) junto con el ADN del fago silvestre.

El ADN del fago silvestre se integraría de la forma habitual, mediante su sistema de recombinación específica de sitio (POP' \times BOB'). Este ADN del fago silvestre actúa como auxiliador respecto del defectivo: le suministra sitios para la recombinación y la función de la integrasa. Por lo tanto, a continuación se produce otro evento de recombinación específica entre ambos ADN de λ .

El resultado es un heterogenote gal^+/gal^- que es doble lisogénico (λ^+/λ_d). Su fenotipo sería Gal^+ y λ^+ , capaz de producir, por inducción partículas de fago silvestres y defectivas.

Supongamos que inducimos ahora este clon doble lisógeno: se producen dos bucles en cada célula, uno que regenera el genoma circular del λ silvestre, y otro que origina el de $\lambda_d gal^+$. Observar, pues, que el resultado de esta inducción es un lisado donde existe un 50% de λ^+ y un 50% de fagos portadores del gen gal^+ . Si este lisado lo usamos para infectar de nuevo una cepa gal^- , la proporción de transductantes Gal^+ será muy alta. Por esta razón, al lisado obtenido por inducción del doble lisógeno λ^+/λ_d se le denomina lisado HTF (alta frecuencia de transducción).

La transducción especializada con el fago λ permitió los primeros aislamientos ("clonaciones") de genes in vivo, pero por supuesto, desde mediados de los años 70 la clonación de genes se realiza ya con métodos de ADN recombinante (ingeniería genética).

Tomado de: Curso de Microbiología General (Enrique Iañez)
<http://www.ugr.es/local/eianezh>
<http://www.ugr.es/local/eianezh>

PERIODOS EXPERIMENTALES: PRACTICA 6

OBJETIVOS

Adiestrar al estudiante en la correcta manipulación de los instrumentos y equipos utilizados en un laboratorio de genética.

Ejercitar al estudiante en la manipulación de bacterias y fagos bajo condiciones asépticas para estudios genéticos.

Poner en evidencia los cambios fenotípicos ocurridos como consecuencia de la transferencia de marcadores genéticos de una cepa a otra mediante transducción generalizada.

Multiplicar una estirpe de bacteriófago y determinar el título de un lisado de fagos.

Ejercitarse en la construcción de un mapa genético de *E. coli* a partir de la estimación de la frecuencia de co-transducción.

La transducción con P1 resulta muy útil en la construcción de cepas isogénicas (idéntico background genético) así como para mapear, en intervalos menores a 2 minutos, el cromosoma bacteriano. Siendo P1 un fago temperado, es ventajoso evitar la formación de lisógenos de la cepa receptora, ya que el P1 residente (profago) puede restringir la entrada del ADN en los cruces sucesivos. Una manera de hacerlo es empleando bajas multiplicidades de infección (MOI): baja relación virus:bacteria. Otra forma, la más común, es utilizar una estirpe mutante del fago P1, P1vir. El fago P1vir es virulento, infecta y se multiplica en cepas lisógenas para P1 y no puede lisogenizar, ya que produce constitutivamente un antirepresor que interfiere con la función del represor cI de P1. Esta cepa de fago será la que emplearemos en nuestros experimentos de transducción.

La cotransducción con P1 es un excelente método para mapear marcadores cromosomales cercanos. En efecto, la probabilidad de que dos *loci* sean incorporados en una misma partícula transductante disminuye con el aumento de la distancia que existe entre ellos. Sin embargo, la frecuencia de cotransducción puede variar de un cruce a otro y para diferentes marcadores. Un ordenamiento más preciso se puede lograr mediante un mapeo de 3 puntos.

Con respecto a la cepa receptora para la producción de partículas transductantes, se pueden obtener lisados de P1 en la mayoría de las cepas de *E. coli* K-12 que sean *recA*⁺, aunque el rendimiento de partículas de fago puede variar significativamente (25-150 fagos infecciosos por célula). Las cepas *recA*⁻ son pobres receptoras para la multiplicación del fago (5 unidades infecciosas por célula), pero pueden funcionar como buenas receptoras de transducción ya que en ellas la obtención de transductantes estables es 10 veces mayor que en las cepas *recA*⁺. En ausencia de la función RecA, el ADN transductor se inserta por recombinación en la célula receptora por la vía de RecF.

1er Período: Multiplicación del fago P1vir en medio sólido.

1) Crecer, a partir de un preinóculo, la cepa receptora (OEG322) en ML conteniendo 5 mM de CaCl_2 .

2) Al día siguiente diluya 1:50 ó 1/100 el cultivo con ML. Diluya el lisado del fago P1 (10^{-5} ó 10^{-6}) y mezcle con el cultivo bacteriano para obtener lisis confluyente. Incube 20 min a 37°C . Agregue 2.5 ml de MLB (conteniendo 0.2% de glucosa) y vierta en placas de MLD preparadas el mismo día sin secar. Incube a 37°C toda la noche sin voltear las cajas.

3) Al día siguiente, si observa lisis confluyente, recoja en tubos estériles el agar blando (agregue 1 ml de ML en la superficie y recoja el material con al ayuda de un rastrillo de vidrio). Añada 0.1 ml de cloroformo por cada 5 ml de mezcla y agite bien en un vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. Centrifugue (5000 RPM) para bajar las células y el agar. Recoja el sobrenadante en un tubo con tapa de rosca estéril. Añada unas gotas de cloroformo y conserve en nevera hasta su uso.

2o Período: Titulación del lisado.

Titule el lisado obtenido en el período anterior tal y como se describe en capítulos anteriores (ver más atrás)

3er Período: Transducción mediada por el fago P1 vir.

1) Crecer el preinóculo de la cepa receptora para la transducción (OEG356) en 5 ml de ML, conteniendo 5mM CaCl_2 y 100 mM MgSO_4 . Al día siguiente centrifugue para bajar las células y resuspenda en el mismo volumen de agua + 5mM CaCl_2 , 100 mM MgSO_4 . Incube 20 min a 37°C sin agitación. Siembre diluciones para contaje de viables en cajas de MLD.

2) Prepare una mezcla de infección en tubos de ensayo: la idea es mezclar el fago multiplicado en la cepa donante (OEG322) con la receptora a una multiplicidad de infección (MOI) cercana a 0.5.

3) Una vez preparada la mezcla de infección, incube 20 min a 37°C . Al finalizar la incubación, centrifugue 10 min, elimine el sobrenadante y resuspenda en agua (5mM CaCl_2 , 100 mM MgSO_4). Siembre sin diluir, 10^{-1} y 10^{-2} por rastrillado en placas de medio selectivo (MM sin factores de nutrición). Incube las placas a 37°C . Recuerde realizar exactamente el mismo protocolo, pero sin agregar los fagos, con el fin de determinar al final el título de bacterias receptoras viables.

4) Al día siguiente cuente el número de colonias transductantes para cada marcador cromosomal y calcule el título en función del factor de dilución. Calcule la frecuencia de transducción para cada marcador según la fórmula

$$\text{FT} = \text{transductantes totales/receptoras viables totales.}$$

4º Período: Cotransducción mediada por el fago P1vir.

1) Con la ayuda de palillos estériles, transfiera 50-100 colonias recombinantes (para un marcador determinado) a una placa conteniendo el mismo MM de donde provienen las colonias (no olvide incluir el antibiótico!). Utilice una plantilla para ubicar la posición de cada uno de los clones transferidos. Incube a 37°C toda la noche.

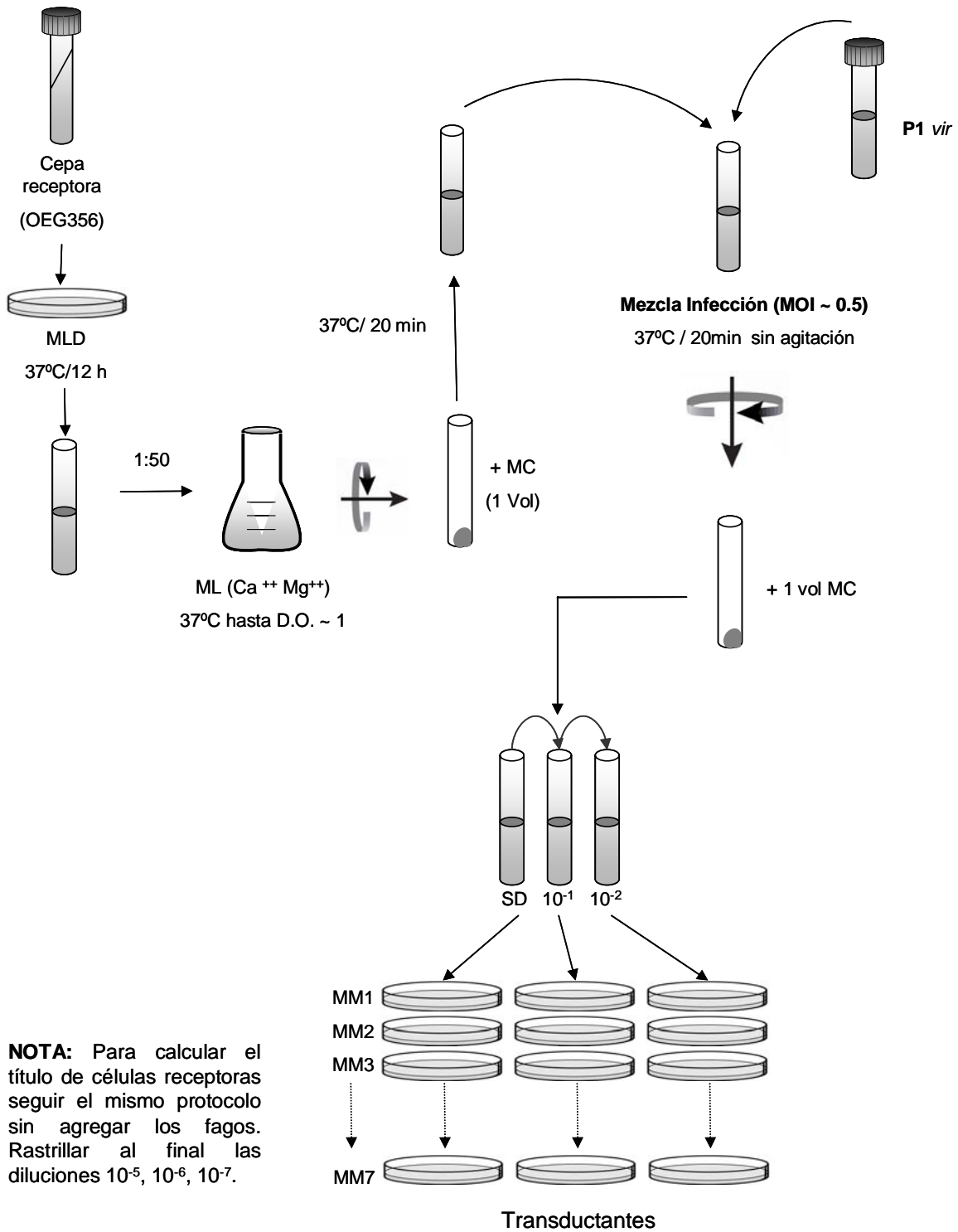
Manual de Laboratorio de Genética I

2) Repique cada uno de los 100 clones a placas de MM selectivo, cada una de las cuales carece de un requerimiento nutricional, para medir así el porcentaje de cotransducción de los diferentes marcadores. Incube a 37°C.

3) Observe el crecimiento en cada una de las placas, cuente el porcentaje de transductantes que adquirieron los dos marcadores simultáneamente. Anote estos valores en la tabla correspondiente. Determine la frecuencia de cotransducción y la distancia entre los marcadores. Compare con las distancias reportadas en la bibliografía (ver mapa genético de *E. coli*)

Medio selección	P1vir × 356 (transducción)		MM1 ()	MM2 ()	MM3 ()	MM4 ()	MM5 ()	MM6 ()
MM-His (His ⁺)								
MM-Pro (Pro ⁺)								
MM-Arg (Arg ⁺)								
MM-Leu (Leu ⁺)								
MM-Thr (Thr ⁺)								
MM-Ade (Ade ⁺)								
MM+Gal (Gal ⁺)								
MM+Lac (Lac ⁺)								

TRANSDUCCIÓN



Extracción y purificación de ADN plasmídico.

Son muchos los métodos que han sido diseñados para purificar plásmidos a partir de bacterias. Invariablemente, estos métodos incluyen los siguientes tres pasos:

Crecimiento del cultivo bacteriano

Cosecha y lisis de las bacterias

Purificación del ADN plasmídico.

Crecimiento del cultivo bacteriano.

Los plásmidos son generalmente purificados a partir de cultivos (en medio líquido conteniendo el antibiótico apropiado) que han sido inoculados con una sola colonia a partir de una placa de medio agarizado. Muchos de los actuales vectores plasmídicos (por ejemplo los de la serie pUC) se replican en alto número de copias y pueden por lo tanto ser purificados en grandes cantidades a partir de cultivos que han sido crecidos hasta bien entrada la fase estacionaria en medio LB. En estos casos no es necesario amplificar el plásmido de manera selectiva.

Cosecha y lisis de las bacterias.

Las bacterias se recuperan por centrifugación y son lisadas mediante uno de muchos métodos que incluyen: el tratamiento con detergentes monoiónicos o diiónicos, el uso de solventes orgánicos, soluciones alcalinas o el tratamiento con calor. La elección de cualquiera de estos métodos está dictaminado por tres factores: el tamaño del plásmido, la cepa de *E. coli* que lo porta y la técnica que se empleará ulteriormente para purificar el ADN plasmídico. Los siguientes criterios pueden ser tomados como reglas generales:

- 1) Los plásmidos de gran tamaño (> 15 kbp), que son susceptibles de fragmentación mecánica, deben liberarse de las células mediante una lisis suave. Para ello, las bacterias son resuspendidas en una solución iso-osmótica de sacarosa y luego tratadas con lisozima y EDTA para desestabilizar la pared celular y la membrana externa. Los esferoplastos resultantes son lisados mediante la adición de detergentes como el SDS. Este método minimiza las fuerzas físicas que son requeridas para liberar los plásmidos del medio citoplasmático “presurizado”.
- 2) Métodos más severos pueden ser utilizados para aislar plásmidos más pequeños. Por ejemplo, luego de añadir el EDTA y, en algunos casos, la lisozima, las células pueden exponerse a la acción de detergentes y son lisadas mediante calentamiento o tratamiento con álcalis fuertes. Estos tratamientos, que rompen abruptamente los puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarios, causan la desnaturalización irreversible del ADN cromosomal. Sin embargo, las dos hebras del ADN plasmídico (circular) no pueden separarse completamente una de otra pues están topológicamente imbricadas. Por lo tanto, cuando las condiciones vuelven a la normalidad (por ejemplo, neutralizando y enfriando la solución) las bandas de ADN plasmídico se renaturalizan, formándose las estructuras superhelicoidales nativas.
- 3) Algunas cepas de *E. coli* liberan cantidades importantes de carbohidratos durante la lisis con detergentes o calor. Esto puede ser un problema a la hora de purificar el ADN plasmídico por centrifugación en gradiente de CsCl. En efecto, los carbohidratos forman una banda densa que ocupa el mismo nivel –en el gradiente– que el ADN plasmídico.
- 4) El método de ebullición no es recomendable cuando se extrae y purifica ADN plasmídico a partir de cepas que expresan la endonucleasa A (cepas *endA*⁺). Esta enzima no es completamente desnaturalizada durante el calentamiento y por esta razón el ADN

plasmídico es degradado durante incubaciones ulteriores en presencia de iones Mg^{++} (por ejemplo, durante la digestión con enzimas de restricción). Este problema puede evitarse incluyendo un paso adicional de extracción con fenol:cloroformo, procedimiento que se utiliza para desnaturalizar proteínas.

- 5) La mayoría de los protocolos que han sido publicados, pueden adaptarse fácilmente para extraer ADN plasmídico a partir de cultivos cuyo volumen va desde 1 ml (“minipreps”) hasta 1 litro (“maxipreps”).

Purificación de ADN plasmídico.

Todos los métodos mencionados se basan en las características particulares de los plásmidos (pequeño tamaño, moléculas circulares) en comparación con el ADN cromosomal (que se fragmenta invariablemente durante la extracción debido a su enorme tamaño). Por ejemplo, la separación entre estos dos tipos de moléculas de ADN pueden realizarse mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico o de exclusión molecular, o bien mediante la precipitación diferencial.

Finalmente el ADN plasmídico, libre de contaminación con proteínas, ADN cromosomal y demás desechos celulares, es precipitado mediante el uso de etanol absoluto o isopropanol, en presencia de algunas sales. Una vez eliminado el exceso de sales remanentes, mediante lavado con etanol 70%, el ADN plasmídico puede resuspenderse con agua o buffer TE.

En la actualidad muchas casas comerciales venden “kits” para extraer y purificar ADN plasmídico de manera sencilla, rápida, eficiente y reproducible. Estos kits, que facilitan enormemente el trabajo cotidiano en los laboratorios de investigación, tienen el inconveniente de ser costosos en comparación con los métodos tradicionales.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis a través de geles de agarosa o poliacrilamida es el método estándar utilizado en el laboratorio para separar, identificar y/o purificar fragmentos de ADN. La técnica es sencilla, rápida, económica y capaz de separar fragmentos de ADN que no pueden ser separados adecuadamente mediante otras técnicas, como la centrifugación en gradiente. Además, la localización del ADN en el gel puede ser determinada directamente, tiñendo el mismo con soluciones de baja concentración de un agente intercalante (el bromuro de etidio), que fluoresce cuando es irradiado con luz UV; bandas que contienen cantidades muy pequeñas de ADN (1-10 ng) pueden ser visualizadas de esta manera. En caso de ser necesario, las bandas pueden cortarse a partir del gel y el ADN puede ser recuperado mediante distintos protocolos para su tratamiento posterior (digestión enzimática, clonamiento, etc).

Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden ser preparados en una variedad de formas, tamaños y porosidades, pudiendo ser “corridos” en diferentes configuraciones. La escogencia de los parámetros más adecuados para la “corrida electroforética” dependerá -en principio- del tamaño de los fragmentos que se pretende separar. Los geles de poliacrilamida son más efectivos para separar fragmentos de pequeño tamaño (5-500 pb). Su poder de resolución (=separación) es extremadamente alto, pudiendo separar fragmentos que difieren tan solo en 1 par de bases. Aunque pueden ser corridos en corto tiempo y pueden utilizarse para separar cantidades importantes de ADN, son más difíciles de preparar y manipular que los geles de agarosa (de hecho, la acrilamida es un potente agente neurotóxico). Estos geles de poliacrilamida se corren en configuración vertical y bajo la acción de un campo eléctrico constante.

Los geles de azarosa, por su parte, tienen un menor poder de resolución, pero un mayor rango de separación. Fragmentos de ADN entre 200 pb y 50 kpb pueden ser separados en este tipo de geles, variando la concentración de los mismos adecuadamente. Los geles de agarosa usualmente se corren en una configuración horizontal y submarina, bajo un campo eléctrico de dirección e intensidad constante. Fragmentos de mayor tamaño (hasta 10.000 kpb) pueden separarse mediante una variante de esta técnica: la electroforesis en campo pulsado. En este caso, la dirección del flujo eléctrico se varía a intervalos regulares.

Agarosa.

Se trata de un polímero que se purifica a partir de algas marinas y está compuesto por monómeros de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa. La agarosa comercial puede adquirirse con unos niveles de pureza lo suficientemente altos como para ser utilizada en experimentos de biología molecular: para ello, es fundamental que la azarosa esté libre de contaminantes y, particularmente, de inhibidores enzimáticos y nucleasas. Por otra parte, la agarosa ha sido modificada químicamente para modificar su temperatura de fusión, obteniéndose un variante que gelifica (y funde) a bajas temperaturas (en comparación con la agarosa normal). Este tipo de agarosa se utiliza con frecuencia en experimentos preparativos y para la digestión *in situ* del ADN. Otro tipo de agarosa permite la separación y el análisis de fragmentos muy pequeños de ADN (entre 10-500 pb).

Los geles de agarosa se preparan fundiendo la agarosa en un horno microondas, en presencia de la solución tampón adecuada (buffer TAE ó TBE, por ejemplo), hasta observarse una solución transparente. Cuando la temperatura ha disminuido hasta 50-60°C, se vierte la solución en un molde adecuado, se le coloca un peine (que contiene los separadores donde será colocada cada muestra de ADN) y se deja enfriar. Una vez que ha gelificado, se forma una matriz porosa, cuya densidad depende de la concentración de la agarosa. Cuando se aplica un campo eléctrico, el ADN -cargado negativamente a pH neutro- migra hacia el ánodo. La tasa de migración dependerá de una serie de parámetros que discutiremos a continuación.

Tamaño (longitud) de los fragmentos de ADN.

Las moléculas de ADN doble banda, que tienden a orientarse bajo un campo eléctrico en una posición paralela a la dirección del mismo, migran a través de matrices gelificadas a una tasa que es inversamente proporcional al \log_{10} de su longitud (en pares de bases). Las moléculas más grandes migran más lentamente debido a la mayor fricción que ocurre entre ellas y el gel y, además, porque “reptan” a través de los poros del gel de manera menos eficiente que las moléculas pequeñas.

Concentración de agarosa.

Un fragmento de ADN de un tamaño definido, migrará a tasas diferentes en geles que contengan distintas concentraciones de agarosa. Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del ADN (μ) y la concentración del gel (τ), que se describe con la siguiente ecuación:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

Donde μ_0 es la movilidad electroforética *libre* del ADN y K_r es el coeficiente de retardo, una constante que está relacionada con las propiedades del gel y la longitud y forma de las moléculas que migran. Por lo tanto, utilizando geles de diferentes concentraciones de agarosa, es posible resolver moléculas de ADN en un rango bastante amplio.

Conformación del ADN (topología).

Las formas superhelicoidales (forma I), circulares abiertas (forma II) y lineales (forma III) de moléculas de ADN del mismo tamaño y secuencia nucleotídica, migrarán a diferentes tasas en un mismo gel de agarosa. Las movilidades relativas de cada una de ellas dependerá principalmente de la concentración de agarosa en el gel, pero también de la intensidad del campo eléctrico, de la fuerza iónica del buffer de corrida, y de la densidad de enrollamiento superhelicoidal (en el caso de la forma I). Bajo ciertas condiciones, la forma I puede migrar más rápido que la forma III; en otras condiciones, la situación puede revertirse.

Intensidad del campo eléctrico.

A bajos voltajes, la tasa de migración de moléculas de ADN lineal es proporcional a la intensidad del voltaje aplicado. Sin embargo, en la medida en que la intensidad del campo eléctrico es incrementada, la movilidad de los fragmentos de gran tamaño aumentará en forma diferencial. Por ello, el rango efectivo de separación en geles de agarosa disminuye en la medida en que se incrementa el voltaje aplicado. Para obtener una resolución máxima de fragmentos de ADN -mayores de 2 kpb- los geles no deben correrse a más de 5 V/cm.

Dirección del campo eléctrico.

Moléculas de ADN mayores de 50-100 kpb de longitud migran a través de geles de agarosa a la misma tasa, si la dirección del campo eléctrico permanece constante. Sin embargo, si la dirección es alterada periódicamente, las moléculas de ADN se verán forzadas a cambiar su orientación durante la corrida. Debido a que las moléculas más grandes tardarán más tiempo en “realignarse” que las más pequeñas, la electroforesis en campo pulsado puede utilizarse para fraccionar poblaciones de moléculas de ADN extremadamente grandes (hasta 10.000 kpb). Esta técnica se utiliza, de hecho, para separar los cromosomas de ciertas levaduras.

Composición nucleotídica y temperatura.

El comportamiento electroforético del ADN en geles de agarosa (en contraste de lo que sucede en geles de poliacrilamida) no es afectada significativamente por el contenido de bases nitrogenadas ni por la temperatura a la cual se corre el gel (entre 4°C y 30°C).

Presencia de agentes intercalantes.

El bromuro de etidio (EtBr), un compuesto fluorescente que se utiliza para detectar ADN en geles de agarosa y poliacrilamida, reduce la movilidad electroforética del ADN lineal en aproximadamente un 15%. En efecto, el colorante se intercala entre pares de bases adyacentes, extendiendo la longitud de la molécula de ADN y tornándola más rígida. El EtBr es un compuesto carcinógeno, que debe ser manipulado con mucho cuidado y precaución!

Composición del tampón de corrida.

La movilidad electroforética del ADN es afectada por la composición y fuerza iónica del tampón de corrida. En la ausencia de iones (por ejemplo si se omite el tampón por error) la conductividad eléctrica es mínima y el ADN migra muy poco (o casi nada). En tampones de alta fuerza iónica (por ejemplo si se usa el tampón 10X) la conductividad eléctrica es muy alta y se genera mucho calor. En el peor de los casos, el ADN se desnaturaliza completamente y el gel se funde. Se pueden utilizar distintas soluciones tamponadas para la electroforesis. Los más comunes se indican en los anexos de este manual.

PERIODOS EXPERIMENTALES: PRACTICA 7

OBJETIVOS

Adiestrar al estudiante en la correcta manipulación de los instrumentos y equipos utilizados en un laboratorio de genética molecular.
Ejercitar al estudiante en la extracción y purificación de ADN plasmídico.
Comparar al menos dos técnicas diferentes para extraer y purificar ADN plasmídico.
Analizar muestras de ADN plasmídico utilizando la técnica de electroforesis en gel de agarosa.
Adiestrarse en la observación de diferentes formas topológicas de una muestra de ADN plasmídico.

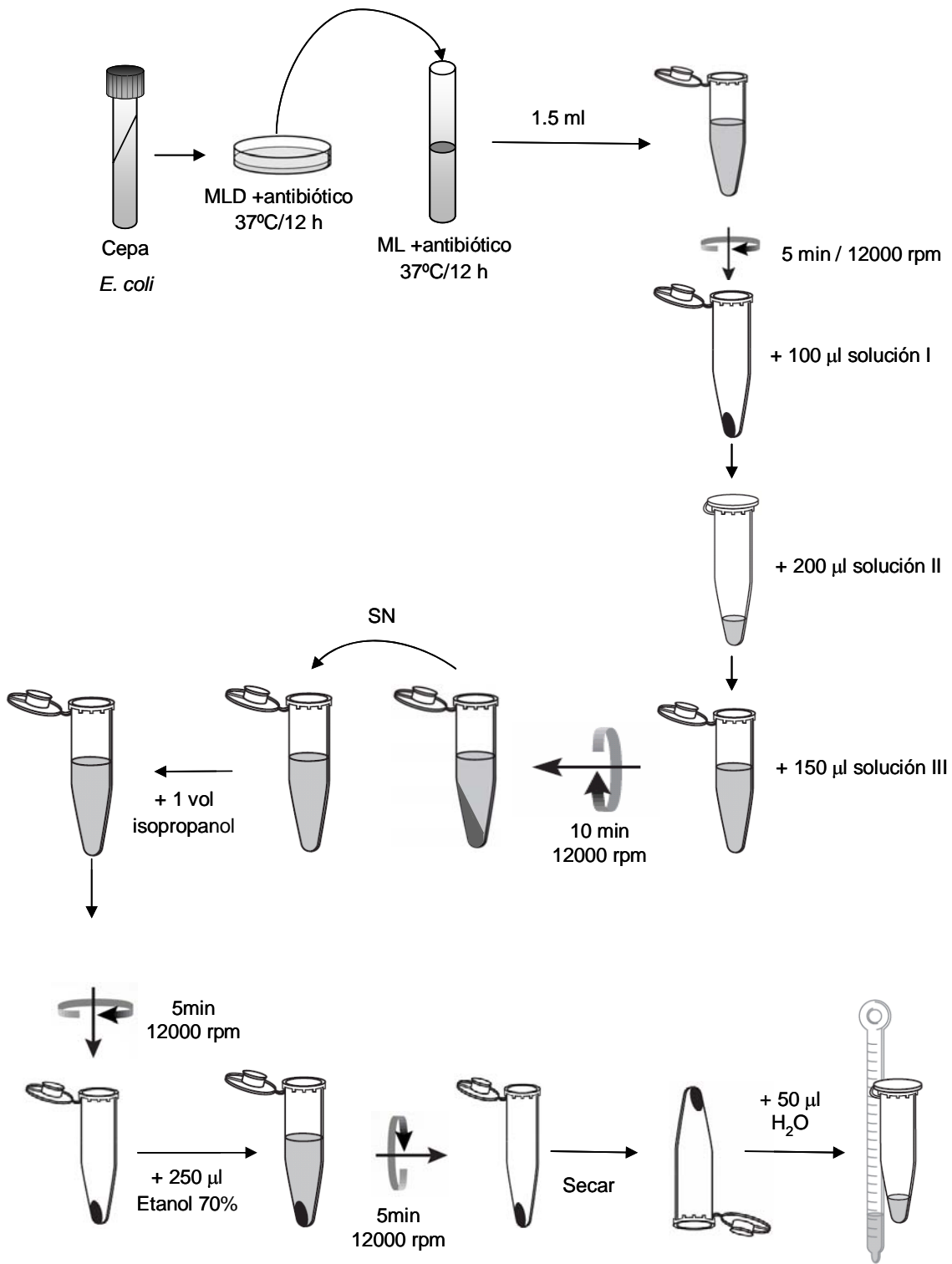
1er Período: Extracción y purificación de ADN plasmídico.

- 1) Crecer, a partir de un preinóculo, las cepas portadoras de distintos plásmidos en ML conteniendo el respectivo agente de selección (antibiótico).
- 2) Al día siguiente diluya 1:50 ó 1/100 el cultivo con ML. Diluya el lisado del fago P1 (10^{-5} ó 10^{-6}) y mezcle con el cultivo bacteriano para obtener lisis confluyente. Incube 20 min a 37°C. Agregue 2.5 ml de MLB (conteniendo 0.2% de glucosa) y vierta en placas de MLD preparadas el mismo día sin secar. Incube a 37°C toda la noche sin voltear las cajas.
- 3) Al día siguiente, si observa lisis confluyente, recoja en tubos estériles el agar blando (agregue 1 ml de ML en la superficie y recoja el material con la ayuda de un rastrillo de vidrio). Añada 0.1 ml de cloroformo por cada 5 ml de mezcla y agite bien en un vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. Centrifugue (5000 RPM) para bajar las células y el agar. Recoja el sobrenadante en un tubo con tapa de rosca estéril. Añada unas gotas de cloroformo y conserve en nevera hasta su uso.

2o Período: Electroforesis en gel de agarosa.

Titule el lisado obtenido en el período anterior tal y como se describe en capítulos anteriores (ver más atrás)

EXTRACCIÓN de ADN PLASMÍDICO



TRANSFORMACION BACTERIANA

1. CONCEPTO Y APROXIMACIÓN HISTÓRICA

La transformación se puede definir como la variación hereditaria de una célula bacteriana susceptible, originada por la captación de ADN desnudo libre en el medio, con la posterior recombinación del exogenote con el cromosoma de la célula en cuestión (endogenote). Tras la transformación, la célula que ha recibido el ADN se suele denominar transformante.

Recordemos brevemente los hitos históricos que jalonan el descubrimiento de la transformación en bacterias:

La transformación fue el primer proceso de transferencia genética que se describió en los procariotas, y este hallazgo constituyó la base para suministrar el primer dato incontrovertible acerca de la naturaleza química del material genético: a partir de 1944 empezó a quedar claro que era el ADN el portador de la información genética de los seres vivos.

Todo comenzó con los trabajos de Griffith (1928) sobre el neumococo. Recuérdense sus clásicos experimentos con las cepas S (lisas, capsuladas y virulentas) y R (rugosas, no capsuladas y avirulentas), inoculadas en ratones:

cepas S vivas inoculadas en ratones \Rightarrow ratón muere
cepas R vivas inoculadas en ratones \Rightarrow ratón vive
cepas S muertas por calor \Rightarrow ratón vive
cepas S muertas por calor + R vivas \Rightarrow ratón muere. La autopsia revela la presencia de neumococos vivos virulentos (tipo S).

Ni Griffith ni los investigadores de la época se dieron cuenta de la importancia de este resultado, ni sacaron la conclusión pertinente: que una sustancia que confiere una nueva propiedad heredable a un organismo (la "sustancia transformante" procedente de las S muertas y que captan las R vivas) debe a su vez ser capaz de replicación. (De hecho, y aunque ahora nos parezca mentira, Griffith pensaba que el principio transformante era el polisacárido capsular de las cepas S, ausente en las cepas R).

En 1944 el equipo formado por Avery, MacLeod y McCarty descubrió la naturaleza del misterioso "principio transformante": el ácido desoxirribonucleico (ADN). Ellos lograron desarrollar un sistema *in vitro*, en el que iban ensayando diversas fracciones (con diferentes componentes) procedentes de las células S virulentas frente a células R vivas. (A pesar de los elegantes experimentos, la comunidad científica no los aceptó inmediatamente ⁽¹⁾, en parte debido a que se suponía más lógico que el material de la herencia fuera algún tipo de proteínas. Al fin y al cabo, las proteínas tienen una enorme variedad, a base de 20 tipos de aminoácidos. ¿Qué diablos podía significar que el ADN fuera el material genético, cuando se sabía que era una molécula monótona e insulsa a base de sólo cuatro tipos de bases nitrogenadas en proporciones casi semejantes?).

El siguiente paso importante sobre la transformación lo da Hotchiss (1949), que realiza ensayos *in vitro* al estilo de los de Avery y compañía, pero con ADN extremadamente puro. Los remisos contestatarios no tuvieron más remedio que empezar a batirse en retirada. Como sabemos, los últimos incrédulos (que en los años 40 eran la mayoría) sólo se convirtieron (tras el correspondiente arrepentimiento y propósito de enmienda) cuando Hershey y Chase (1952) realizaron sus ingeniosos experimentos de marcado del ADN y de las proteínas de un fago. Poco más tarde irrumpieron Watson y Crick con su modelo de la doble hélice, que sugería el modo de

duplicación de la información genética ...pero en fin, todo esto nos aleja de nuestra historia, y no queremos convertir nuestra narración en un caso de "novela dentro de otra novela", al estilo de Cervantes.

2. TRANSFORMACIÓN NATURAL

2.1 CARACTERES GENERALES DE LA TRANSFORMACIÓN NATURAL

1. El ADN, para que sea capaz de transformar, ha de ser de cadena doble.
2. Para cada evento de transformación basta la interacción de una sola molécula de ADN con la célula receptora. Por otro lado, el número de moléculas de ADN que puede tomar una misma célula es limitado, y presenta una cinética de saturación (meseta que indica que ya no se pueden captar más moléculas). Observen la cinética de orden 1 en la primera parte de la curva. A partir de cierta concentración de ADN transformante, se da la meseta de saturación (no aumenta el n° de colonias transformadas).
3. No todas las células de un mismo cultivo son transformables en cualquier momento del ciclo de crecimiento. La competencia es el estado fisiológico característico que permite captar ADN del medio exterior. Este estado de competencia es diferente para cada especie bacteriana capaz de experimentar transformación, y dentro de cada especie está influido por una serie de parámetros como:

densidad celular del cultivo
temperatura
pH
nutrientes (fuentes de C o de N, iones...)

Ejemplos:

En *Streptococcus pneumoniae* la competencia afecta al 100% de las células en fase exponencial. En cambio, en *Bacillus subtilis* solamente una minoría (1-20%) de células se hacen competentes, y sólo durante la fase estacionaria.

Se denomina fase de eclipse durante la transformación al período transitorio durante el cual, si se extrae el ADN recién entrado (exogenote), este ADN es incapaz de volver a transformar. Es decir, tras su entrada a la célula receptora, el ADN del exogenote parece haber "desaparecido" transitoriamente a efectos de capacidad transformadora (ya veremos por qué).

En la transformación natural de diversas especies bacterianas se dan una serie de fases comunes a todas ellas, aunque en cada caso existen rasgos propios:

1. Competencia
2. Unión y entrada del ADN exógeno a la célula
3. Fase de eclipse
4. Destino del ADN exógeno (exogenote): recombinación con el endogenote.

En la naturaleza, la fuente de ADN exógeno suele ser la lisis espontánea de células de la misma especie, que actúan como "donadoras" (una especie de inmólación o suicidio altruista, para mayor gloria -o sea, para mayor supervivencia- de la especie). En otros casos no hay lisis, sino que parte de la población bacteriana extruye ADN, que pasa al medio.

Existen varios géneros con especies que poseen sistemas naturales de transformación:

Entre las bacterias Gram positivas los ejemplos más estudiados son: *Streptococcus* y *Bacillus*
Entre las bacterias Gram negativas: *Haemophilus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, cianobacterias del género *Synechococcus*.

A continuación describiremos algunos de los sistemas de transformación mejor conocidos. Primero abordaremos los de bacterias Gram positivas, y posteriormente aludiremos más brevemente a los de Gram negativas, comentando las diferencias de éstas respecto de las primeras.

2.2 TRANSFORMACIÓN EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS:

Los sistemas de estas bacterias Gram positivas son inespecíficos respecto de la captación de ADN exógeno: no distinguen entre ADN homólogo (de la misma especie) o ADN heterólogo (de otras especies). Sin embargo, aunque físicamente puede entrar ADN heterólogo, éste se recombina posteriormente con el endogenote sólo en el caso de presentar con él un grado de homología suficientemente alto. Únicamente se recombinan moléculas de ADN de la misma especie (o en algunos casos, de especies muy cercanas).

Veamos comparativamente los procesos de transformación en el neumococo (*S. pneumoniae*) y en *B. subtilis*:

2.2.1 En *Streptococcus pneumoniae*

Desarrollo de la competencia (y modo de unión del ADN a la superficie celular):

Como dijimos, el estado de competencia se encuentra condicionado por una serie de factores, como densidad celular, temperatura, pH, etc.

La competencia se desarrolla al final del periodo de crecimiento exponencial (fase logarítmica);

Afecta prácticamente a la totalidad de las células del cultivo (100% de células competentes).

Conforme las células van creciendo (se van multiplicando), van sintetizando y excretando al medio un péptido específico (de 5-10 kDa), llamado factor activador de la competencia (FAC). Este factor no ejercerá su efecto hasta que la densidad celular alcance un valor del orden de una 10^7 células/ml, momento en el que el FAC se habrá acumulado hasta lograr una concentración adecuada para ejercer su función.

Entonces, el FAC se une a un receptor específico de la superficie celular, lo que provoca (no se sabe cómo) la inducción de la expresión de una serie de genes, que codifican unas 12 proteínas específicas de la transformación, entre las que se cuenta una autolisina.

Esta autolisina provoca una degradación parcial y controlada de la pared celular, de modo que quedan al descubierto complejos de proteínas que son sitios de unión al ADN exógeno (existen unos 30-80 sitios de unión por cada individuo de neumococo).

El ADN exógeno libre en el medio se une a estos sitios, que cuentan con una actividad endonucleasa específica de transformación: provoca incisiones en una de las hebras del ADN c.d. El extremo 3' generado queda unido a alguna proteína del complejo receptor.

Las incisiones consecutivas en una misma molécula de ADN exógeno están separadas entre sí por una media de una 6 kb.

Recordemos que el ADN no tiene por qué ser específico: se puede unir ADN de procedencias muy diversas (incluso ADN eucariótico).

Entrada del ADN y fase de eclipse

Esta fase se pone de manifiesto en el laboratorio por el hecho de que el ADN exógeno se convierte a una forma resistente a la DNasa. Esto significa que este ADN ha sido transportado desde el medio externo al interior celular (o al menos a algún "compartimento" donde se ve protegido del ataque de la nucleasa). Este paso del proceso de transformación depende de:

- cationes divalentes (Mg^{++} , Ca^{++}), o monovalentes (K^+);
- una endonucleasa situada a nivel de membrana (endonucleasa-I), que degrada la cadena que previamente (en la fase 1^a) había permanecido intacta.

En *S. pneumoniae*:

La endonucleasa-I de membrana rompe la cadena que previamente había quedado intacta, y a partir del sitio de corte va degradando esta cadena no unida al complejo receptor (liberando oligonucleótidos de 1 a 10 bases de longitud). Simultánea y concomitantemente con esta acción, la otra cadena (la que antes se había unido al receptor) va pasando al citoplasma, comenzando por su extremo 3', y progresando hacia su extremo 5', a expensas precisamente de la energía derivada de la hidrólisis de la cadena opuesta.

Conforme va entrando, esta cadena va siendo recubierta por monómeros (de unos 20 kDa) de una proteína específica, hasta formarse el complejo de eclipse (entre ese ADN de c.s. y las proteínas). Dicho complejo cumple dos funciones:

- protege al exogenote del ataque de las nucleasas citoplásmicas;
- prepara al exogenote para la ulterior fase de recombinación.

Si utilizáramos este ADN de c.s. del complejo de eclipse para intentar una nueva transformación, no podría ser reconocido por el complejo receptor que describimos anteriormente. Esta es la razón de la existencia de lo que hemos denominado período de eclipse.

Destino del ADN del exogenote

Recombinación de la cadena sencilla del exogenote con la zona complementaria del endogenote, previo desplazamiento y ulterior degradación de la cadena homóloga de éste. Esta recombinación homóloga es muy eficiente (un 50% del ADN transportado se integra).

Como resultado de esta integración se forma un heterodúplex.

Si el heterodúplex posee malos emparejamientos de bases (debido a que la secuencia del exogenote no es idéntica a la del endogenote), pueden ocurrir dos alternativas, dependiendo de si estos malos emparejamientos logran o no ser reparados antes del siguiente ciclo de replicación del cromosoma:

1. si son reparados antes de la replicación se puede perder el marcador portado por el endogenote, que se ve sustituido por el del exogenote;
2. si el heterodúplex no se repara en el siguiente ciclo replicativo cada cadena servirá de molde para una nueva doble hélice, pasando cada una a una célula hija. De este modo, a partir de este evento de recombinación surge una progenie mixta: existe un subclon recombinante y otro que no lo es.

Es de destacar que, además, *S. pneumoniae* posee un sistema muy refinado para facilitar esta recombinación en los fenómenos de transformación: existe un gen (*hex*) que codifica una proteína que se une a varios lugares concretos del genoma hospedador, e interviene en la corrección de las bases mal emparejadas. Si el exogenote se integra lejos de uno de los sitios

reconocidos por Hex, no se ve reparado por dicho sistema, el heterodúplex "escapa" a la corrección, y por lo tanto toda la progenie heredará el marcador nuevo procedente del exogenote.

2.2.2 En *Bacillus subtilis*

Las principales diferencias respecto del modelo del neumococo, en esta fase inicial de competencia, son las siguientes:

La competencia se desarrolla después de la fase exponencial, durante el inicio de la fase estacionaria.

Los "cultivos competentes" son heterogéneos: existe una minoría de células (< 25%) auténticamente competentes, y se encuentran en un estado metabólico alterado:

- no replican más su cromosoma;
- se embarcan en pocas actividades biosintéticas;
- aumenta el número de mesosomas, muchos de ellos concentrados en la región ecuatorial.

Desarrollo de la competencia

Los últimos hallazgos sobre este sistema parecen indicar que la competencia en *B. subtilis* está sometida a tres tipos de controles:

1. Primer control, según la fase de crecimiento. Esto parece depender en última instancia de la acumulación en el medio de un factor de competencia excretado durante la fase previa a la estacionaria. El factor interacciona durante la fase estacionaria con receptores de superficie, que "reemiten" la señal al interior celular, para que se induzcan una serie de genes relacionados con la transformación.

2. Segundo control, de tipo nutricional. Para que se induzca la competencia, el medio de crecimiento ha de poseer glucosa como fuente de C, junto con una mezcla de aminoácidos. Las señales nutricionales que detecta la bacteria para provocar el estado de competencia parecen depender (al menos en parte) del agotamiento de algunos aminoácidos y de alguna señal derivada del metabolismo de la glucosa.

3. Tercer control, según el tipo celular. Como acabamos de decir, existen células competentes y no competentes. Es aún un misterio cómo se desarrolla este "dimorfismo" para la competencia. Lo que sí se sabe es que durante todo el crecimiento, algunas células (probablemente las no-competentes) excretan al medio ADN de alto peso molecular, que será la fuente del ADN transformante.

De esos controles, el mejor conocido hasta ahora es el relacionado con la densidad celular, basado en la detección de una feromona, y que depende de un sistema regulador de dos componentes:

Mientras *B. subtilis* va creciendo, va segregando un péptido, denominado feromona ComX. Obviamente, en un sistema cerrado, dicha hormona se va acumulando en el medio.

Cuando se alcanza cierto nivel de ComX (y esto sólo sucede a partir de ciertas densidades altas de cultivo), esta feromona interacciona con una proteína de membrana denominada CompP. CompP es una histidín-proteín-quinasa, del tipo de los sensores autofosforilables. Cuando se le

une CompX, ComP se autofosforila, y entonces fosforila a su vez a una proteína citoplásmica llamada ComA.

ComA~P es un regulador de respuesta, que en ese estado fosforilado actúa como activador de la transcripción de varios genes, incluyendo el gen *srfA*, que se requiere para inducir otros genes del estado competente. (Curiosamente, parecen existir vínculos entre desarrollo de la competencia y esporulación y no sólo mera coincidencia de sus respectivos desencadenamientos en el tiempo, ya que hay genes que intervienen en la regulación de ambos procesos).

2.3 TRANSFORMACIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Una diferencia característica de los sistemas en Gram negativas con respecto a los de Gram positivas es que el estado de competencia no depende de señal activadora segregada al medio. En las especies del género *Neisseria* las células se mantienen competentes durante todo el ciclo de crecimiento, cosa excepcional dentro de los sistemas naturales de transformación. Además, la transformación sólo se da en las cepas fimbriadas de *Neisseria* (poseedoras de pelos o fimbrias, o sea, fenotipo Fim⁺). Comparemos la transformación en *Haemophilus* (por ejemplo, en la especie *H. influenzae*) con la de los sistemas Gram positivos estudiados más arriba:

La competencia se da en fase estacionaria.

La competencia afecta al 100% del cultivo.

La competencia se induce internamente, no existiendo factores liberados que actúen desde fuera.

El sistema de entrada del ADN discrimina entre ADN de esta especie (o, en todo caso de especies cercanas) y ADN de otras procedencias: solamente capta ADN de especies del mismo género, y con gran eficiencia. La secuencia en cuestión es la siguiente (se muestra sólo una de las cadenas): 5'AAGTGCGGTCA-3'. Dicha secuencia aparece repetida y repartida en el genoma de *H. influenzae* unas 600 veces, a una media de una copia cada 4 kb. Como se puede comprobar, esta frecuencia es muy superior (3 órdenes de magnitud) a la que predice el cálculo de probabilidades en el caso de que apareciera aleatoriamente (4000 kb). Así pues, el genoma de estas bacterias está "preparado" (mediante la existencia sobreabundante y no-aleatoria de esta secuencia) para participar en eventos de reconocimiento específico por parte de receptores encaminados a la entrada de ADN propio por medio de fenómenos de transformación.

Esta selectividad de secuencia se debe a la existencia de unos pocos (3-4) complejos receptores de superficie, dispuestos en prolongaciones vesiculares de la membrana externa (transformosomas), que reconocen esa secuencia específica de 11 pb a partir de trozos de ADN de cadena doble de unas 30 a 50 kb.

El ADN entra en forma de doble cadena a través del transformosoma.

No existe complejo de eclipse entre ADN y proteínas.

El ADN de c.d. del exogenote se despliega en sus dos cadenas, una de las cuales es recombinada con la porción equivalente del endogenote (por desplazamiento de la porción homóloga de ese endogenote).

2.4 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LA TRANSFORMACIÓN NATURAL

Como acabamos de ver, los sistemas naturales de transformación representan mecanismos, a veces bastante sofisticados, de transferencia génica en ciertas bacterias, y no deben en absoluto considerarse como meras "curiosidades" o "accidentes" de algunos procariotas. Géneros como *Haemophilus*, *Streptococcus* o *Bacillus* presentan exquisitos refinamientos moleculares encaminados, en última instancia, a facilitar expresamente la recombinación genética tras un proceso específico de transformación, induciendo una serie de funciones totalmente exclusivas para tal propósito. Estos mecanismos han debido de evolucionar debido probablemente a ciertas presiones selectivas del ambiente, y han sido "aprovechados" para producir un plus de diversidad genética, que debe de jugar un papel importante en la dinámica ecológica de las especies que lo poseen. Así, por ejemplo, parece ser que el sistema de transformación de *Neisseria gonorrhoeae* (el gonoco) permite que esta bacteria cambie más fácilmente determinadas moléculas de superficie, de modo que estos cambios antigénicos suponen una ventaja adaptativa para evadir el sistema inmune del hospedador mamífero.

Una pregunta más difícil de responder es la del origen evolutivo de la capacidad de transformación. Aquí caben diversas hipótesis.

Hipótesis de la reparación de ADN: sugiere que la capacidad de competencia apareció en *B. subtilis*. (esporulante) como un sistema de obtener moldes de ADN para la reparación. La argumentación sigue el siguiente curso: se sabe que la competencia en esta especie está regulada por controles que son en parte comunes con los del desencadenamiento de la esporulación (recordar que decíamos que en *B. subtilis* la competencia se induce en fase estacionaria, lo cual también ocurre con la esporulación). Por otro lado, también se recordará que al final de la fase exponencial ocurren grandes cambios metabólicos en esta bacteria, siendo uno de ellos el que pasa de un metabolismo fermentativo a uno oxidativo. En el metabolismo oxidativo se producen numerosos radicales libres, que pueden provocar daños en el ADN. Por lo tanto -concluye esta hipótesis-, no sería extraño que la competencia hubiera evolucionado como una forma de obtener ADN de repuesto, que captarían ciertos individuos de la población, para usarlos en la reparación de sus genomas. Posteriormente el sistema se refinaría y serviría para incrementar la variabilidad genética y la capacidad de adaptación. (De hecho, en *B. subtilis* y en *S. pneumoniae* se ha visto que el gen *recA* de la recombinación homóloga se induce en respuesta al desarrollo de la competencia.

Hipótesis de la nutrición: Quizá pudo surgir como una manera de obtener nutrientes adicionales a partir de ADN exógeno.

Hipótesis de la recombinación: pudo haber una presión selectiva que favoreciera el desarrollo de un mecanismo de intercambio y recombinación de ADN, por los que las poblaciones de ciertas bacterias podrían poner a prueba nuevas combinaciones de genes (algo parecido a lo que pasó con el desarrollo de la sexualidad en los eucariotas). Ello aumentaría la diversidad y podría acelerar la evolución. De hecho, algunas de las especies transformables de modo natural "excretan" ADN durante el crecimiento. Ese ADN, captado en el caso de *Haemophilus* o *Neisseria* de un modo muy específico, puede favorecer la adaptación de otros miembros de la especie. De hecho, en esas especies, parece que la transformación aumenta la diversidad antigénica, y por lo tanto son mejores las probabilidades de sobrevivir en el hospedador al que parasitan.

3. TRANSFECCIÓN

Se define la transfección como la infección de una célula hospedadora mediante ADN obtenido de un virus. El ADN del virus así introducido, al expresar su programa genético en la célula, termina desencadenando la producción de nuevas partículas de virus dentro, que al igual que

en la infección "clásica" por virus completos, conduce a la muerte y lisis de la célula, con la liberación de la progenie de nuevos viriones. Las características de unión de ADN y entrada dependerán del sistema de células competentes que se esté empleando, mientras que el resultado de la transfección depende (al igual que en los ciclos líticos naturales de los virus) del programa del virus en cuestión.

4. TRANSFORMACIÓN ARTIFICIAL

Muchas especies bacterianas carecen de sistemas naturales de transformación. En los últimos años se ha logrado desarrollar sistemas artificiales para producir "células competentes" en algunas de ellas (como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y algunas especies de *Pseudomonas*), lo cual ha hecho avanzar los estudios genéticos, especialmente mediante manipulaciones *in vitro*: por ejemplo, la transformación artificial de *E. coli* con ADN plasmídico es una de los métodos básicos de la Ingeniería Genética.

La obtención de células competentes en *E. coli* consiste en ir concentrando un cultivo recogido en fase logarítmica, mediante lavados sucesivos en una solución fría (4°C) de CaCl₂, tras lo cual la mezcla de células y ADN se someten a unos 2 min. a 42°C (choque por calor). Este tratamiento altera las envueltas (sobre todo la membrana externa) y aumenta su permeabilidad al ADN. Los plásmidos entran a la célula como moléculas de cadena doble intactas, mientras que los ADN lineales, que entran de la misma forma, son degradados por nucleasas citoplásmicas (RecBCD). Los transformantes se suelen seleccionar en base a la resistencia a algún o algunos antibióticos conferidos por los plásmidos artificiales usados en Ingeniería Genética.

En otras bacterias (p. ej., en ciertas Gram-positivas) el método consiste en obtener protoplastos en medio hipertónico, y posterior tratamiento de éstos mezclados con el ADN con un agente como el polietilenglicol, que fomenta la fusión de protoplastos y el englobamiento de ADN exógeno.

Más recientemente se ha introducido la técnica de la electroporación: las células se someten a cortos pulsos de corriente eléctrica de alto voltaje, lo cual altera las envueltas y permite la captación de ADN en una amplia variedad de bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

Tomado de: Curso de Microbiología General (Enrique Iañez)

1998 ENRIQUE IAÑEZ PAREJA.

<http://www.ugr.es/local/eianez>

actualizado 1998-08-06

BIOLUMINESCENCIA BACTERIANA

PERIODOS EXPERIMENTALES: PRACTICA 8

OBJETIVOS

Adiestrar al estudiante en la preparación de células competentes por el método del CaCl_2 .

Poner en evidencia los cambios fenotípicos ocurridos como consecuencia de la transferencia de marcadores genéticos de una cepa a otra mediante transformación bacteriana.

Calcular la eficiencia de transformación mediada por plásmidos recombinantes y utilizando células competentes por el método del CaCl_2 .

Preparación de células competentes.

1) Crecer, a partir de un preinóculo, las cepas receptoras (DH5 α -pHK555 y DH5 α -pHK724) en ML conteniendo el respectivo agente de selección.

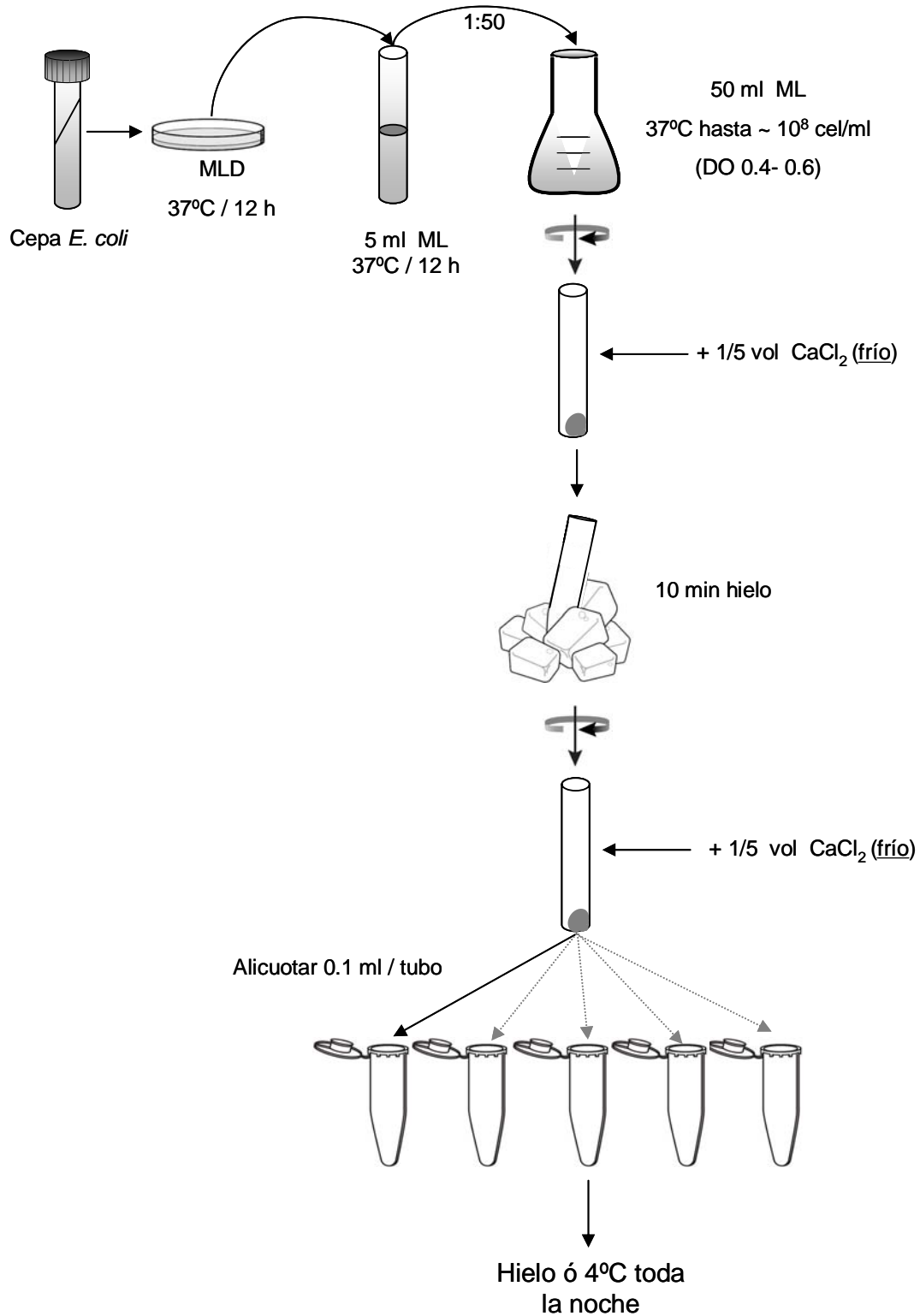
2) Al día siguiente diluya 1:50 ó 1/100 el cultivo con ML. Diluya el lisado del fago P1 (10^{-5} ó 10^{-6}) y mezcle con el cultivo bacteriano para obtener lisis confluyente. Incube 20 min a 37°C. Agregue 2.5 ml de MLB (conteniendo 0.2% de glucosa) y vierta en placas de MLD preparadas el mismo día sin secar. Incube a 37°C toda la noche sin voltear las cajas.

3) Al día siguiente, si observa lisis confluyente, recoja en tubos estériles el agar blando (agregue 1 ml de ML en la superficie y recoja el material con al ayuda de un rastrillo de vidrio). Añada 0.1 ml de cloroformo por cada 5 ml de mezcla y agite bien en un vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. Centrifugue (5000 RPM) para bajar las células y el agar. Recoja el sobrenadante en un tubo con tapa de rosca estéril. Añada unas gotas de cloroformo y conserve en nevera hasta su uso.

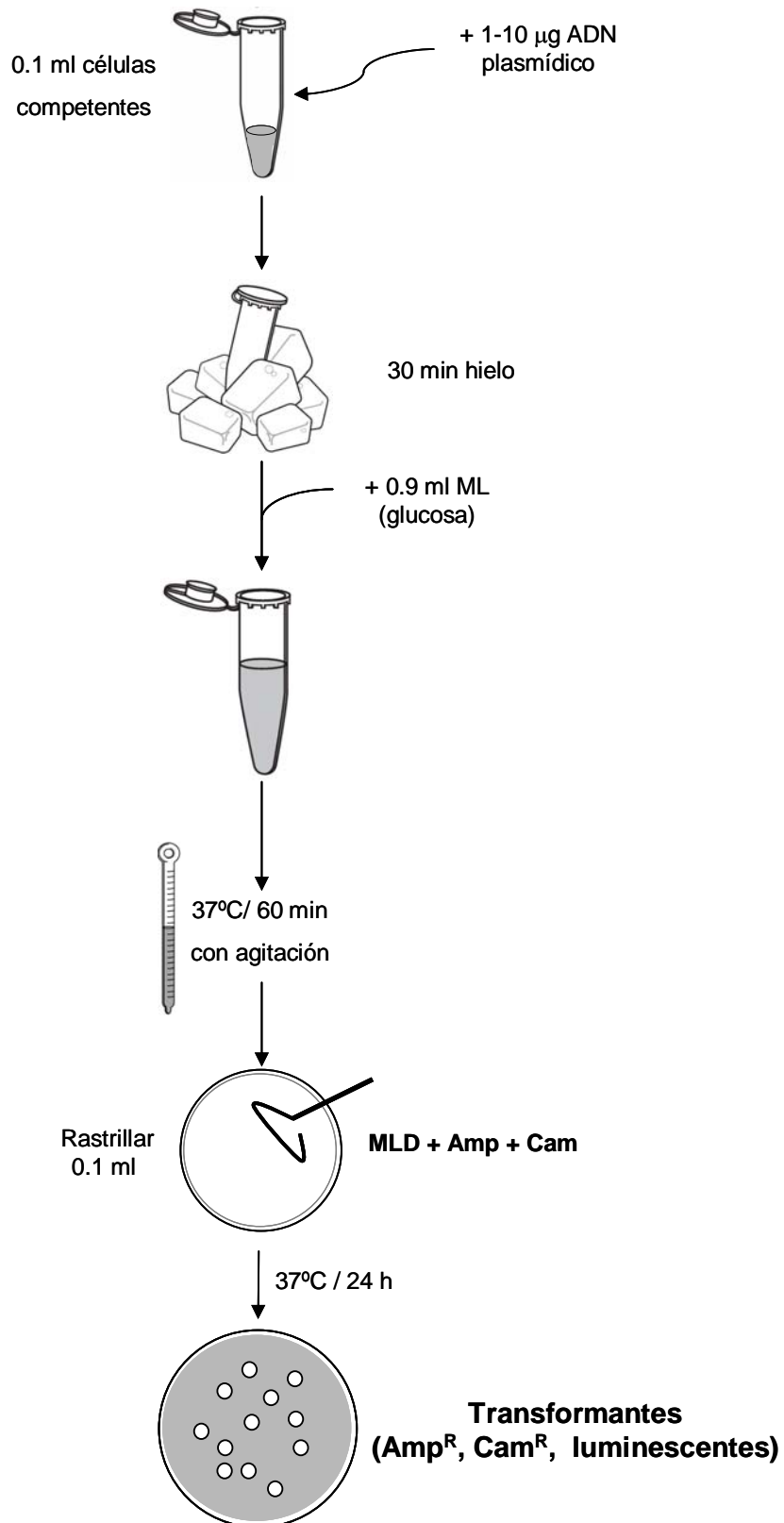
Transformación bacteriana.

Titule el lisado obtenido en el período anterior tal y como se describe en capítulos anteriores (ver más atrás)

PREPARACIÓN de CELULAS COMPETENTES



TRANSFORMACIÓN BACTERIANA



Anexo 1. Composición de medios de cultivo.**Medio Luria-Bertani (LB)**

Bacto triptona*	10 g
Extracto de levadura**	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	csp 1 litro

Si se trata de MLD agregar 15g/l de agar; si se va a preparar MLB, añadir 7,5 g/l de agar.

*La Triptona (de carne o de caseína) es un digerido de tejidos animales obtenido mediante una digestión con tripsina.

**El extracto de levadura es la porción soluble de células de levadura autolizadas. Se trata de un compuesto de composición indefinida, rico en nitrógeno y en vitaminas del grupo B.

Agar nutritivo blando.

Bacto Peptona***	5 g
Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	3 g
Agar****	7,5 g
H ₂ O	csp 1 litro

***La peptona (de carne o de caseína) es un digerido péptico de tejidos animales (ó de caseína de leche). En el primer caso, se trata de un compuesto rico en azufre. Las peptonas promueven el desarrollo abundante de una amplia variedad de microorganismos.

****El agar bacteriológico se utiliza para la preparación de medios agarizados (sólidos y semisólidos). Su punto de gelificación está entre los 32-39°C; su punto de fusión se ubica entre los 80-88°C.

Medio DOC (base)

Bacto Peptona	20 g
Trizma Base	1,5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Rojo neutro	0,03 g
H ₂ O	csp 1 litro

A este medio hay que agregar el desoxicolato de sodio, previamente esterilizado por filtración, y el azúcar que corresponda (glucosa, lactosa, galactosa).

Agar 2 ×

Agar	30 g
H ₂ O	csp 1 litro

El agar 2× se utiliza en la preparación de cualquier tipo de medio agarizado que lo requiera. Simplemente, se sustituye la mitad del volumen final a preparar por esta solución de agar (en lugar de H₂O destilada, se agrega el agar 2×). De esta forma la concentración final del agar será 1×, es decir, 15 g/l. **OJO:** se debe fundir en microondas antes de emplearlo!

Medio Mínimo (MM) 2 X

KH_2PO_4	5,88 g
K_2HPO_4	7,77 g
$\text{Na}_3\text{H}_5\text{C}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,12 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
H_2O	csp 1 litro

A este medio hay que agregarle los requerimientos nutricionales específicos de cada cepa (aminoácidos, vitaminas, bases nitrogenadas, etc).

Sitios Internet recomendados.

Genetica de bacterias y de virus (University of Newfoundland) (EXCELENTE!)

<http://www.mun.ca/biochem/courses/4103/lectures.html>

Microbiología General (Iañez) (EXCELENTE) incluye Genetica Bacteriana

<http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/programa.htm>

Micro 316 (Microbial Genetics) (EXCELENTE!) (University of Illinois)

<http://www.life.uiuc.edu/micro/316/supplement.html>

Modern Genetic Analysis (EXCELENTE!)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=mga>

Molecular Biology (Lectures) (University of California)

<http://www-biology.ucsd.edu/classes/bimm100.WI00/lectures.html>

Biology of Microorganisms (Brock)

<http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/brock/>

Gene Expression and its Regulation (University of Alberta)

<http://www.biology.ualberta.ca/courses/genet304/index.php?Page=2604>

Microbial Genetics and Metabolism

<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit4/index.html>

Bacterial Conjugation

http://www.mun.ca/biochem/courses/4103/topics/bact_conjugation.html