



DESARROLLO DE UN SISTEMA CONJUGATIVO INTERESPECIFICO *E.coli* - BACTERIAS GRAM POSITIVAS.

Valbuena, N. ⁽¹⁾, Sandoval, H. ⁽²⁾, Castro, J.M. ^(1,2), Letek, M. ⁽¹⁾, Mateos, L.M. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Area de Microbiología, Universidad de León.

⁽²⁾ Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León.

Introducción

Los microorganismos Gram-positivos usados en ensayos de ingeniería genética suelen ser recalcitrantes a la hora de ser transformados debido entre otras cosas a su gruesa pared celular y a la presencia de enzimas que destruyen el material genético exógeno (sistemas de restricción).

En corinebacterias y bacterias del ácido láctico (LAB), microorganismos de un gran interés biotecnológico, los procesos de transformación utilizados son en ocasiones tediosos, obteniéndose en muchos casos eficiencias de transformación insuficientes para los objetivos planteados.

Durante la década de los años noventa se desarrollaron sistemas de conjugación interespecíficos *E. coli*-corinebacterias utilizando plásmidos movilizables suicidas o bifuncionales como vehículos de transferencia de marcadores en especies de los grupos *Corynebacterium* y *Brevibacterium*. El replicón usado en estos ensayos deriva del plásmido conjugativo RP4 (perteneciente al grupo IncP). Uno de los plásmidos movilizables más utilizados ha sido pK18mob (1) que presenta el replicón del plásmido pUC, el origen de transferencia de RP4 (*oriT*) y el gen de resistencia a Kanamicina (del transposón Tn5) así como el gen *galZ* (Figura 2). Como cepa donadora se utilizó *E. coli* S17-1 la cual contiene los genes implicados en el proceso de conjugación integrados en el cromosoma, complementando en trans las funciones necesarias para la movilización del plásmido.

Las eficiencias de transferencia obtenidas en estos ensayos superaron en algunos casos el 2%, principalmente cuando se utilizaron mutantes Res- como *B. lactofermentum* R-31 (2) o sometiendo las células a choques térmicos que destruyeran los mecanismos de restricción (3).

Siguiendo este modelo se ha intentado exportar un sistema análogo de conjugación que permitiera conseguir buenas eficiencias de transferencia interespecífica entre *E. coli* y bacterias LAB.

Resultados

(i). Análisis de resistencias

Las bacterias LAB utilizadas en los ensayos fueron especies tipo del grupo de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Para ello se realizaron diferentes análisis de resistencia/sensibilidad a varios antibióticos con el fin de poder utilizar los correspondientes genes de resistencia como marcadores en las distintas cepas analizadas. Las condiciones de ensayo fueron en todos los casos estándar, teniendo en cuenta entre otros factores el estado de crecimiento del cultivo y tomado cantidades de inóculo equivalentes para cada ensayo. En la Figura 1 se muestran dos antibiogramas representativos, correspondientes a *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*.



Figura 1. Antibiogramas.

- a) Oxacilina 1µg
- b) Amoxicilina 10 µg
- c) Cloramfenicol 30 µg
- d) Rifampicina 5 µg
- e) Eritromicina 10 µg
- f) Clindamicina 2 µg

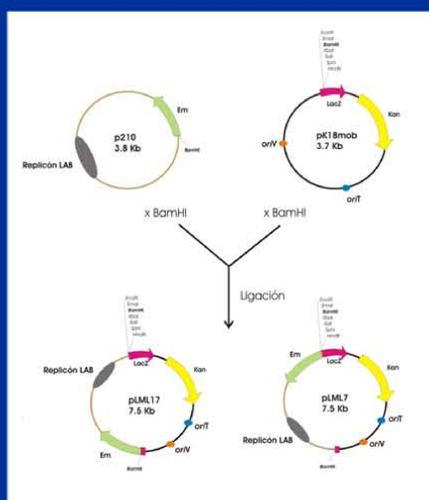


Figura 2. Construcción de los plásmidos movilizables pLML7 y pLML17.

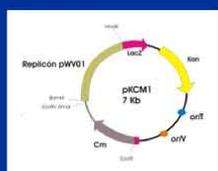


Figura 3. Esquema del plásmido movilizable pKCM1.

(ii). Construcción de vectores movilizables bifuncionales para LAB.

Los ensayos se realizaron utilizando el plásmido pK18mob (Figura 2) descrito previamente para los ensayos con corinebacterias. En la construcción de vectores bifuncionales se fusionó pK18mob con el plásmido p210 (4) el cual contiene un replicón de *Lactococcus lactis* (procedente del plásmido pSH72) y el gen de resistencia a Eritromicina procedente de pE194 (5). Los plásmidos generados fueron denominados pLML7 y pLML17 y se transfirieron a la cepa *E. coli* S17-1 que actúa como cepa donadora en el proceso. El ensayo de apareamiento (donador / receptor) fue a grandes rasgos análogo al descrito para los ensayos de conjugación *E. coli*-corinebacterias (2). Los resultados obtenidos fueron positivos para las dos cepas de bacterias LAB ensayadas: *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*, independientemente del plásmido utilizado. Los plásmidos obtenidos de los correspondientes transconjugantes pertenecientes a estas dos cepas fueron en todo caso idénticos sin observar reorganizaciones aparentes y manteniéndose estables incluso en ausencia de presión selectiva.

Un nuevo plásmido bifuncional fue el obtenido a partir del plásmido pWV01 procedente de *Lactococcus lactis*; para ello se amplificó por PCR el replicón de pWV01 incluido en el plásmido pGK12 (6) dejando extremos *Bam*HI/*Hind*III y ligándolo con el vector movilizable pK18mob. Al plásmido generado se le adicionó el gen de resistencia a cloramfenicol (con extremos *Eco*RI/*Eco*RV) procedente del plásmido pLP825 (7) obteniendo el plásmido pKCM1 (Figura 3) el cual fue utilizado en ensayos de conjugación interespecíficos análogos a los descritos anteriormente y obteniendo igualmente resultados positivos.

El marcador de selección utilizado para *E. coli* fue kanamicina; a partir de la información procedente del antibiograma se utilizaron los genes de resistencia para eritromicina y cloramfenicol en LAB; la selección de transconjugantes en bacterias LAB se realizó por presencia del antibiótico ácido nalidixico el cual actúa como bacteriostático en *E. coli* y eritromicina o cloramfenicol según los casos.

Bibliografía

- (1) Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 1994. Gene. 145, 69-73.
- (2) Mateos LM, Schafer A, Kalinowski J, Martin JF, Pühler A. 1996. J Bacteriol. 178, 5768-75.
- (3) Schafer A, Schwarzer A, Kalinowski J, Pühler A. 1994. J Bacteriol. 176, 7309-19.
- (4) Baltasar Mayo, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), cesión personal.
- (5) Horinouchi S. and Weisblum B., 1982. J Bacteriol. 150, 804-814.
- (6) Posno et. al. 1991. Appl Environ Microbiol. 57, 1822-1828.
- (7) Kok J., van der Vossen J., Venema G. 1984. Appl Environ Microbiol. 48, 726-731.