

INESTABILIDAD GENÉTICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS INMOVILIZADAS

C. Bulbarela Sampieri, P. Veiga, M. López del Castillo Lozano, S. Furlan y S. Kulakauskas. UBLO, INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France. Universidad Politécnica de Huatusco, Av. 1 No. 728, CP 94100, Huatusco Veracruz, México. Universidad Veracruzana, ICB calle Rafael Sánchez Altamirano s/n. Km. 3.5, Carretera Xalapa-Las Trancas. C.P. 91192. Xalapa, Veracruz, México. Email. carmen.bulbarela@gmail.com

Inmovilización, proteína M6, EPS.

Introducción. Las bacterias se inmovilizan por unión en superficies, formación de agregados o por retención en una matriz extracelular. En la industria lechera, las bacterias se encuentran en este estado; ya que, la leche coagulada no es un líquido y no permite un crecimiento planctónico. Esta restricción disminuye el acceso a los nutrientes, lo cual da origen a una presión selectiva favoreciendo la aparición de mutantes, quienes tienen mayores posibilidades de desplazarse.

Metodología. Se desarrolló un método que nos permite estudiar el crecimiento no planctónico de las bacterias Gram(+) no móviles. Las bacterias son atrapadas en una matriz constituida de medio de cultivo con una baja concentración (0.03%) de agar¹⁻⁴. En estas condiciones la inmovilización bacteriana puede ser incrementada por la formación de cadenas¹⁻³ o por la producción de exopolisacáridos⁴, en ambos casos las bacterias forman una colonia redonda (Fig. 1A). La limitación de la expansión de la colonia y el acceso limitado al medio nutritivo fresco da lugar a un agotamiento "in situ" de los nutrientes y a un crecimiento lento de las colonias^{2, 3}. Estos factores crean una presión selectiva provocando la aparición de mutantes observables como "raíces"²⁻⁴ (Fig. 1B).

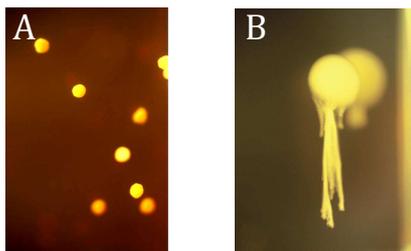


Fig. 1. Crecimiento de *L. lactis* en medio semilíquido.

Resultados y discusión. La expresión de la proteína M6 en *Lactococcus lactis*, provoca que las células se "peguen" formando largas cadenas, que son atrapadas en el medio semilíquido. Las bacterias portadoras de una mutación en la proteína M6 se observan como "raíces" ya que sedimentan más rápido (Fig. 2C). En estos mutantes encontramos que además de las mutaciones ocurridas en el plásmido –portador de M6–, las cepas tenían mutaciones adicionales a nivel cromosómico. La cepa mutante (*L. lactis* M6^{mut}) fue curada del plásmido mutado (*L. lactis* M6⁻) presentando un crecimiento más lento, un nivel diferente de resistencia a la menadiona, a la mitomicina C y al MMS en comparación con la cepa

silvestre, también fue capaz de producir mayor cantidad de colonias resistentes a la rifampicina (10X), fenotipo de célula mutador. Este fenotipo se confirmó cuando por la transformación de *L. lactis* M6⁻ se generaron colonias M6⁻ negativas ("raíces") con mayor frecuencia. Cuando la cepa mutador se transformó con el plásmido EPS⁺, las células fueron inmovilizadas por la producción de EPS, y las mutantes EPS⁻ –que sedimentan más rápido– aparecieron con mayor frecuencia en la cepa mutador (Fig. 2D) que en la cepa silvestre (Fig. 2E). Este hecho sugiere que el fenotipo mutador no está restringido a la inmovilización debido a la expresión por M6, sino que también sea activo en otros tipos de inmovilización. La determinación de secuencia en los alelos M6⁻ reveló que, en comparación con la cepa silvestre la cepa mutador presenta un mayor número de mutaciones complejas: deleciones acompañadas con duplicaciones o inserciones (Fig. 2F).

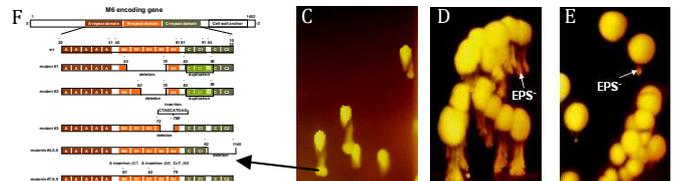


Fig. 2. (C) *L. lactis* mutador pM6, (D) *L. lactis* mutador pEPS, (E) *L. lactis* silvestre pEPS, (F) mutaciones encontradas en pM6.

Conclusiones. La inmovilización crea una presión selectiva y conduce a la acumulación de mutaciones en la pared celular de lactococos, por lo tanto; puede verse como un factor de diversificación de las comunidades bacterianas^{2, 3, 4}. Nuestros resultados demuestran que el mecanismo de inducción de tal diversidad puede implicar la aparición de alelos mutadores.

Bibliografía.

- Mercier C., Domakova E., Tremblay, J., and Kulakauskas, S. 2000. Effects of a muramidase on a mixed bacterial community. *FEMS Microbiol. Lett.* 187:47-52.
- Mercier C., Durrieu C., Briandet R., Domakova E., Tremblay J., and Kulakauskas S. 2002. Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 46: 235-243.
- Ibrahim M., Briandet R., Mistou M.-Y., Chrétien A., Tremblay J., and Kulakauskas S. 2004. Immobilisation des lactocoques. *Lait* 84 : 103-114.
- Llull D., Veiga P., Tremblay, J., and Kulakauskas S. 2005. Immobilization based selection of capsule negative mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 151: 1911-1917 .