



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA
ANTIMICROBIANA DE LA CEPA BACTERIANA CAE-01**



DIRECCION ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**



PRESENTA:

DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

AGOSTO. 1999

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO.

B.1690930



CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIMICROBIANA DE LA CEPA BACTERIANA CAE-01

Tesis realizada por **DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



M. C. Ma. DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA

ASESOR:



M. C. ANTONIO SEGURA MIRANDA

ASESOR:



M. C. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

34426

Chapingo, México, Agosto de 1999.

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIMICROBIANA DE LA CEPA BACTERIANA CAE-01

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ**, autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en **PROTECCIÓN VEGETAL**, estuvo constituido por:


PRESIDENTE: _____

M. C. Ma. DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA


ASESOR: _____

M. C. ANTONIO SEGURA MIRANDA


ASESOR: _____

M. C. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

Chapingo, México, Agosto de 1999.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Departamento de **Parasitología Agrícola** de la **Universidad Autónoma Chapingo** por su financiamiento y así poder continuar con mi superación profesional.

A la **M. C. Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía** por su acertada dirección del presente trabajo y por su gran amistad.

A los profesores **M. C. Antonio Segura Miranda** y **M. C. Ernestina Valadez Moctezuma** por sus sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo

A mis amigos: **Gijón, Pavón** y **Bolaños**, por todos esos momentos de trabajo y alegría.

A don **Leonides** por su apoyo incondicional y por su amistad.

A los compañeros del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario por su gran apoyo.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron a la finalización del presente trabajo.

DEDICATORIA

A mi padre **Francisco Mejía Castillo**. A quien le debo todos mis triunfos.

A **Rosa María Maldonado Martínez**, por su gran amor a la vida y por lo que compartimos.

A la familia **Acosta Rodríguez**, por su gran apoyo y amistad incondicional.

DATOS BIOGRÁFICOS

DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ, nació en Sanctorum Tlaxcala, México, el 25 de Marzo de 1967. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, obteniendo el título de Biólogo Experimental (1996). Ha participado en diversos cursos relacionados con la protección vegetal en foros de carácter Nacional e Internacional. En 1996 inicia los estudios de Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En Septiembre de 1998 se incorpora al Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal como responsable del área de bacterias fitopatógenas.

CONTENIDO

	Página
Índice de cuadros.....	i
Índice de figuras.....	ii-iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Las bacteriocinas y su importancia.....	4
2.2. Obtención de ADN.....	9
2.3. Plásmidos.....	10
2.3.1. Historia.....	11
2.3.2. Propiedades.....	12
2.3.3. Propiedades conferidas a sus hospedantes.....	13
2.3.3.1. De resistencia.....	13
2.3.3.2. Metabólicas.....	14
2.3.3.3. Fenotípicas y simbióticas.....	15
2.3.3.4. Incompatibilidad y exclusión.....	16

2.3.3.5. Interacción con fagos.....	17
2.3.4. "Curando " a las bacterias de plásmidos.....	17
3. MATERIALES Y METODOS.....	22
3.1. Material biológico.....	22
3.2. Proteína.....	22
3.3. Caracterización Física y Química.....	22
3.3.1. Termoestabilidad.....	22
3.3.2. Contenido de Nitrógeno.....	23
3.3.3. Contenido de Fósforo.....	23
3.3.4. Peso molecular.....	24
3.3.4.1. Electroforésis en geles de poliacrilamida.....	24
3.4. Caracterización genética.....	26
3.4.1 "Curación " de plásmidos a las bacterias.....	26
3.4.2. Aislamiento de Acidos Nucleicos.....	27
3.4.3. Purificación de plásmidos.....	28
3.4.4. Electroforésis en geles de agarosa.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	31
4.1. Caracterización Física y Química.....	31
4.1.1. Comportamiento de la bacteriocina al calor.....	31
4.1.2. Contenido de Nitrógeno y fósforo.....	32

4.1.3. Peso molecular de la bacteriocina.....	33
4.2. Caracterización Genética de la bacteriocina.....	34
4.2.1. Tratamiento de la cepa antagonica CAE-01 con naranja de acridina y bromuro de etidium para la eliminación de plásmidos.....	34
5. CONCLUSIONES.....	39
6. LITERATURA CITADA.....	40
7. APENDICE.....	46
7.1. Medio para el crecimiento de las bacterias.....	46
7.2. Reactivos para la electroforésis en poliacrilamida.....	47
7.2.1.preparación del gel de corrimiento al 10%.....	46
7.2.2. Preparación del gel de empaquetamiento.....	47
7.2.3. Buffer de corrimiento.....	47
7.2.4. Reactivos para la tinción con plata.....	48
7.2.4.1. Solución de plata.....	48
7.2.4.2. Solución reveladora.....	48
7.2.4.3. Solución para detener la reacción.....	48
7.3. Reactivos para la electroforésis en gel de agarosa.....	48
7.3.1. Solución de tinción.....	49
7.3.2. Solución desnaturalizante.....	49
7.3.3. Buffer de carga.....	49

7.3.4. Buffer de corrimiento.....	49
7.4. Buffer para la suspensión de las bacterias centrifugadas.....	50
7.5. Varios.....	50
7.5.1. Solución de lisozima.....	50
7.5.2. Buffer.....	50

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ejemplos de agentes para curar plásmidos bacterianos.....	19
Cuadro 2. Halo de inhibición (cm) de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por la cepa antagónica en presencia de bromuro de etidio	35
Cuadro 3. Halo de inhibición (cm) de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por la cepa antagónica en presencia naranja de acridina.....	36

Índice de figuras

Fig. 1. Inhibición de <i>A. Radiobacter</i> hacia <i>A. tumefaciens</i>	7
Fig. 2. Estructura química del Agrocín 84.....	8
Fig. 3. Curva de calibración empleada en La determinación de fósforo de la bacteriocina.....	32
Fig. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodesilsulfato de sodio al 10% de la bacteriocina purificada con sulfato de amonio. En la columna de la izquierda corresponden a los pesos de las proteínas de referencia.....	33
Fig. 5. Curva de calibración de marcadores de peso molecular obtenidos en geles de poliacrilamida en presencia de dodesil sulfato de sodio (SDS-PAGE) empleada para estimar el peso molecular de la proteína antimicrobiana.....	34

Fig. 6. Inhibición *in vitro* de la cepa antagónica CAE-01 sobre *C. m.* subsp. *michiganensis* mostrando; (A) testigo, (D) 100 y (F) 250 $\mu\text{g/ml}$ de naranja de acridina.....

36

Fig. 7. Electroferésis en gel de poliacrilamida-dodesilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de la fracción de los ácidos nucleicos de la cepa antagónica CAE-01. El carril 1 corresponde al marcador molecular; el carril 2 a los ácidos nucleicos de la cepa sin tratar y en los carriles 3, 4, 5, y 6 corresponden al ADN plasmídico obtenido después del tratamiento con naranja de acridina a las concentraciones de 20, 50, 100, 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.....

38

RESUMEN

La cepa bacteriana CAE-01 presenta propiedades antagónicas hacia bacterias y hongos fitopatógenos, dicha actividad involucra la síntesis de una bacteriocina de naturaleza proteica. Con el objeto de iniciar la caracterización de esta sustancia, en el presente trabajo, se determinó su peso molecular, contenido de fósforo y nitrógeno y así conocer su estabilidad y posibilidades de aplicación en el control biológico de enfermedades en las plantas, también se investigó su origen genético por lo que la cepa antagónica fue tratada con naranja de acridina y bromuro de etidio para eliminar sus plásmidos. Su capacidad inhibitoria fue evaluada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los resultados indicaron que la bacteriocina tiene un peso molecular de 87.9 kilodaltones y un contenido de fósforo de 1.15% y nitrógeno de 14.9 % y que su codificación no está regulada por plásmidos; estas características permiten inferir que su empleo para el manejo de enfermedades no implica ningún riesgo de transferencia de material genético vía plásmidos con otras bacterias.

Palabras clave: bacteriocina, control biológico, curar de plásmidos, antagonismo.

ABSTRACT

The bacterian CAE-01 strain shows antagonic properties with phytopatogenal bacteria and fungus , this activity needs the synthesis of a proteic nature bacteriocin. With the idea of beginning this sustance caracterization, this work, was determined with its molecular weight, phosphorus and nitrogen contents , so we could be able to know its stability and application possibilities in the biologic plant disease control. Its genetic source was also studied, so the antagonic strain was worked with acridine orange and etidium bromide to eliminate plasmids. Its inhibition properties were evaluated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The end product showed that the baconian has a molecular weight of 87.9 kilodaltons and a phosphorus 1.15 % and a nitrogen 14.9% content. Its dosification is not dosificated with plasmids. This characteristics showed us that its handle against diseases does not represents any hazard with genetic material transfer plasmid-via with other bacteria.

Key words. Bacteriocin, biological control, curing plasmid, antagonism.

1. INTRODUCCION

Las enfermedades de las plantas, causadas por bacterias fitopatógenas, han ocasionado pérdidas a la agricultura y a la horticultura por muchos años. Estos efectos se reflejan en reducción en la disponibilidad de alimentos, productos vegetales de menor calidad, incremento en los costos de producción y finalmente, elevación de los precios. Para muchas enfermedades, los métodos tradicionales de control químico no son viables económicamente, además para el caso de las bacterias existen pocos ya que éstas tienden a desarrollar fácilmente resistencia, por si fuera poco, los productos químicos también ponen en riesgo la salud del ser humano, la seguridad y dañan el ambiente (Larkin, 1998).

Una medida complementaria para el manejo de estos organismos, es la búsqueda y explotación de organismos antagónicos (Fravel, 1988; Liao, 1989; Kerr and Htay, 1973; Ellis *et al* 1979), no sólo por evitar el deterioro del ambiente sino también porque pueden reducir los costos de producción al promover el crecimiento de las plantas (Sigee, 1993).

El estudio de este tipo de organismos ha permitido conocer su mecanismo de acción y con ello extraer los principios activos para generar bactericidas de uso intensivo y en algunas ocasiones incluso se ha podido transferir el carácter antagónico a tejidos vegetales y obtener materiales resistentes a plagas y enfermedades en menor tiempo (Basurto *et al*, 1990). Rodríguez y Mejía (1995) reportan a la cepa antagónica CAE-01, la cual tiene

la capacidad de inhibir el desarrollo *in vitro* de 20 especies bacterianas y 3 especies de hongos fitopatógenos, así mismo, realizando trabajos *in vivo* (Rodríguez *et al*, 1995; Gijón, 1996) se ha detectado reducción en la severidad de algunas enfermedades con la aplicación de esta bacteria.

Los sistemas antagónicos más conocidos realizan esta actividad inhibidora de una forma natural, es decir, mantienen las poblaciones microbianas en equilibrio, esto por diversos mecanismos entre los que destacan la producción de moléculas como los antibióticos, los sideróforos o las bacteriocinas (Sigee, 1993). Estudios detallados indican que algunas de estas moléculas inhibidoras de microorganismos están reguladas por plásmidos bacterianos lo que las hace inviables para ser usadas como agentes de control biológico dada la capacidad de las bacterias de intercambiar material genético vía plásmidos, como en el caso de *Agrobacterium radiobacter* al ser usada contra *Agrobacterium tumefaciens* (Crow, 1998).

Estudios preliminares para entender el modo de acción de la cepa antagónica CAE-01 sugieren que en este proceso antagónico se encuentra involucrada una bacteriocina (Mejía y Rodríguez, 1995). Tomando en cuenta el gran potencial que representa esta bacteria para ser usada como agente de control biológico y con la finalidad de conocer su modo de acción para establecer una explotación adecuada, se han planteado los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVOS

- 1). - Determinar las propiedades físicas y químicas de la proteína antimicrobiana producida por la cepa antagónica CAE-01.

- 2). - Determinar si la información genética para la síntesis de la proteína inhibitoria se localiza en el genoma o en material extracromosómico (plásmidos).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Las bacteriocinas y su importancia

Los primeros estudios de este tipo de moléculas se remontan a 1925, cuando Andre Gratia (Citado por Reeves, 1972) descubrió que una cepa de *Escherichia coli* producía un antibiótico altamente específico (Principio V, llamado así porque era de una especie virulenta) y que actuaba contra otras cepas de la misma especie. A la sustancia se le denominó colicina V. Este nombre posteriormente fue empleado para agrupar a antibióticos similares producidos por miembros de la familia Enterobacteriaceae. Cuando se descubrió que la producción de estas sustancias no se restringía a los organismos coliformes, Jacob *et al* (citado por Revees, 1972) propusieron el término bacteriocina para "proteínas antibacterianas altamente específicas, producidas por ciertas cepas de bacterias y que son activas contra algunas otras de la misma especie" (Reeves, 1972; Tagg y Megiven, 1971 y Vidaver, 1983).

A partir de entonces, se han realizado diversos trabajos con el propósito de aislar e identificar agentes productores de bacteriocinas, así también, se han desarrollado metodologías que permiten descifrar los mecanismos de acción de estas bacterias. En términos generales se dice que las bacteriocinas deben cumplir con una o más de las siguientes propiedades: 1. Ser inactivadas por enzimas proteolíticas; 2. Ser retenidas por membranas de diálisis como el

celofán; y 3. Ser precipitadas por agentes como la acetona o el sulfato de amonio. (Tagg y Megiven, 1971).

En estudios posteriores, el interés por las bacteriocinas se enfocó a su mecanismo de acción. Las evidencias sugieren que las bacteriocinas se ponen en contacto con la célula hospedante por medio de receptores específicos de la superficie de la bacteria y que una vez que le permiten la entrada, mata a la bacteria mediante diversas vías, una de ellas es afectando el flujo de energía, ya que se ha visto que la colicina de tipo E1-ML cuando se adiciona a una cepa patógena de *E. coli*, su respiración se ve afectada durante un periodo de 20 minutos (Reeves, 1972), también ocurre que algunas bacteriocinas (tipo E2) interfieren con el metabolismo del ADN, ya que experimentos en *E. coli* K12 demuestran que se detiene la síntesis de ADN de 2-5 minutos y de ARN por 15 minutos, además de interferir con la síntesis de ADN, llegan a degradar al ya existente. Presumiblemente el efecto de estas bacteriocinas es activando una endonucleasa que convierte al ADN de una sola cadena en uno de doble cadena, entonces el ADN generado es degradado por acción exonucleolítica (Reeves, 1972), otro modo de acción de las bacteriocinas es inhibiendo la síntesis de proteínas, estas bacteriocinas (tipo 3) afectan la subunidad 30S del ribosoma, ya que con el tratamiento de E3-CA-38, el patrón de proteínas obtenido por electroforésis en gel de poliacrilamida difiere en la subunidad 30S y la proteína es funcional si se reconstituye con RNA de ribosomas no afectados (Reeves, 1972), otras bacteriocinas como megacin A-216 actúan rompiendo el potencial osmótico de las membranas bacterianas (Reeves,

1972). Es importante mencionar que las bacteriocinas pueden actuar por uno de los mecanismos mencionados anteriormente o por una combinación de ellos.

El sistema más estudiado y el único que se encuentra disponible a nivel comercial (<http://www.orst.edu/dept/bptany/epp/guide/B/blacrocan.html>) para el control biológico de fitopatógenos es el desarrollado por Kerr and Htay en 1973. Este sistema fue descubierto al aislar cepas de *Agrobacterium radiobacter* que se encontraban cercanas a la enfermedad, y al hacer inoculaciones mixtas, se notó la habilidad de esta bacteria de competir con la especie patógena de *Agrobacterium tumefaciens*. Diversas cepas no patógenas ayudaron a reducir la enfermedad; sin embargo, *A. radiobacter* cepa K84 en particular prevenía el desarrollo de la agalla cuando se ponía en proporción 1:1 con la cepa patógena, es por ello que ha sido un modelo a estudiar desde diversos puntos, incluyendo el molecular. Cabe mencionar que el control sólo es de carácter preventivo, no curativo, así que su presencia protege las heridas de la invasión del patógeno.

Los estudios en laboratorio se realizaron inoculando en el centro de una caja de petri con *Agrobacterium radiobacter* cepa K84 e incubándola por 24 horas, transcurrido el tiempo, la bacteria se mató con vapores de cloroformo y se le adicionó una capa de agar. *A. tumefaciens* se asperjó sobre este medio y se observó un halo de inhibición en donde había sido colocada la cepa K84 (Fig. 1). Esto sugería que la cepa K84 producía un inhibidor y que ejercía el control contra cepas de *A. tumefaciens*. La particularidad de esta inhibición fue que la cepa de *A. tumefaciens* porta un plásmido Ti productor de nopalina, pero

no así con aquellas productoras de octopina y agropina. Esto sugería que el inhibidor actuaba contra bacterias relacionadas (Reeves,1972).

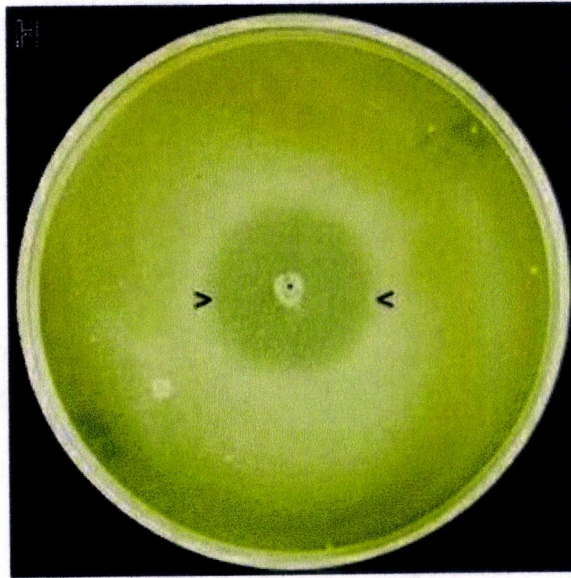


Fig. 1. Inhibición de *A. radiobacter* hacia *A. tumefaciens*.

Estudios relacionados con este tipo de sustancia presente en el medio de cultivo, indicaban que no era de amplio espectro como los antibióticos "convencionales", pero sí tenía un comportamiento similar a las bacteriocinas ya que actuaba específicamente contra las mismas cepas bacterianas o con cepas muy relacionadas. De cualquier forma, como las bacteriocinas conocidas tenían algún carácter proteico, se buscó su naturaleza de esta sustancia y se determinó que presentaba una estructura única, y se le denominó agrocina 84 (Fig. 2). Esta se caracterizó como un nucleosido, los derivados azucarados atacando a un carbón 6-fosfato glucofuran y un pentamin metilado (Vidaver, 1983).

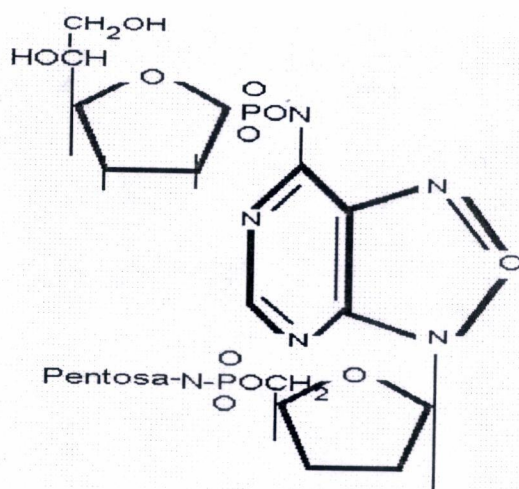


Fig. 2. Estructura química del Agrocina 84.

En un estudio realizado por Kerr and Htay (1973) para determinar el efecto de Agrocina 84 sobre la infección del tomate por *A. tumefaciens*, sembraron plantas de tomate en el suelo y las inocularon con diferentes cepas de este patógeno, otras plantas fueron inoculadas con una mezcla 1:1 de bacteria patógena y bacteria antagónica K84 y encontraron que las cepas 529 y T57 que portan un plásmido Ti que codifica para nopalinas fueron controladas por la cepa K84; sin embargo, las cepas 8150 y 502 que portan un plásmido Ti que codifica para otro tipo de opinas no fueron controladas, corroborando la toxicidad selectiva del Agrocina 84.

La selectividad hacia las cepas productoras de nopalina se puede explicar porque este tipo de bacterias ocasionan que la planta produzca agrocinaopinas, y el plásmido Ti codifica para una agrocinaopina permeasa específica que permite la entrada de nutrientes. Agrocina 84 entra a la bacteria a

través de estas permeasas y como es un nucleótido análogo, bloquea la síntesis de ADN del patógeno (Crow,1998).

2.2. Obtención de ADN

Se han desarrollado diversos métodos para la obtención del ADN bacteriano dependiendo de los fines que se persiga en la investigación, así existen métodos que no requieren la integridad del ADN, por lo tanto utilizan métodos drásticos que sólo permiten la caracterización de esta molécula; sin embargo, existen casos en que se requiere ADN integro para fines de secuenciación o clonación. Por lo general, a la bacteria se le hace crecer en un medio de cultivo específico, posteriormente es lisada con algún tratamiento, para el caso de bacterias gram negativas, es suficiente someterlas a un tratamiento con dodesilsulfato de sodio (SDS) a temperaturas de 60°C, y para la mayoría de las bacterias gram positivas es necesario tratarlas adicionalmente con alguna enzima como la lizosima, proteinasa K, acromopeptidasa, N-acetilmuramidasa y pronasa antes de adicionarle el SDS (también conocido como lauril sulfato de sodio), con un shock osmótico, con lisis alcalina y hasta con sonicación, de cualquier forma, el objetivo es la destrucción de la integridad celular (Klement *et al*, 1990).

Cuando se ha logrado lisar a la bacteria, el paso siguiente es la separación de los componentes celulares en donde se encuentra mezclado el ADN (cromosómico y plasmídico), por lo general la separación de éstas se logra

por centrifugación, con la adición de algunas sustancias desproteinizantes (cloroformo, alcohol isoamílico o fenol). También se puede emplear 2-mercaptoetanol con el fin de inactivar nucleasas coextraídas y finalmente este ADN es separado por diversos métodos que incluyen gradientes de cloruro de cesio, de sacarosa y cromatografía con tierras de diatomeas entre otros. Lo importante es considerar que los ácidos nucleicos forman complejos con proteínas y estos se pueden disociar usando detergentes iónicos y concentración de sales. Se adicionan además agentes quelantes que remueven los metales polivalentes y se ajusta el pH a condiciones alcalinas (Maniatis *et al*, 1989). Todos los métodos existentes para la extracción y purificación de ADN siguen tres principios básicos, lo que da como resultado eficiencia y variabilidad en el grado de pureza de los ácidos nucleicos, estos pasos básicos son; la habilidad para romper la célula, la capacidad para mantener estable el ADN extraído, sobretodo el uso de productos que inhiben la actividad de nucleasas y finalmente, la versatilidad en la purificación de este ADN (Dellaporta y Pesano, 1981).

2.3. Plásmidos

De manera natural, la información genética esencial de una bacteria, se localiza en una molécula de ADN circular, de doble cadena: el cromosoma. Pero también, la mayoría de las bacterias tienen otras moléculas de ADN que se replican en armonía con sus hospederos y se les denomina plásmidos, los cuales portan genes que codifican para funciones específicas, por ejemplo,

resistencia a antibióticos, virulencia, catabolismo de sustancias fenólicas y fijación del nitrógeno (Grinsted y Bennett, 1988).

De acuerdo con vidaver (1983), los plásmidos son entidades genéticas pequeñas, circulares, de carácter extracromosómico, autoreplicativos y que son portados por muchas bacterias y algunos organismos eucarióticos; portan secuencias genéticas que proporcionan algunas ventajas para la supervivencia de estos organismos. Estos son ampliamente usados en Ingeniería Genética como vectores de clonación.

2.3.1. Historia

El primer plásmido identificado fue el factor de fertilidad (F) de *E. coli*, este plásmido se descubrió por su capacidad de mediar la transferencia de un marcador cromosómico de una cepa de *E. coli* a otra (Hayes, 1968). Estos experimentos iniciales con genética de bacterias, señalaban que los factores de fertilidad podrían separarse físicamente del cromosoma bacteriano, y unos años después se demostró que estos factores de fertilidad eran moléculas circulares de ADN de doble cadena, (Hayes, 1968). Ya por los años 50s, en Japón, se había detectado que algunas cepas de *Shigella* habían desarrollado resistencia hacia algunos antibióticos. Estudios posteriores determinaron que esta propiedad estaba codificada por plásmidos (Watanabe y Fukasawa, 1962).

Durante todo este tiempo, las investigaciones se desarrollaron en torno a los factores de fertilidad y los mecanismos de resistencia hacia los antibióticos, especialmente en los hospitales en donde se encuentra una gran variedad y cantidad de antibióticos; sin embargo, con el tiempo se dieron cuenta que estos plásmidos también conferían otras propiedades fenotípicas a la célula bacteriana. En años recientes los plásmidos se han utilizado en ingeniería genética como vectores de clonación y finalmente muchos estudios han demostrado que estos elementos genéticos no sólo tienen importancia desde el punto de vista científico, también revisten importancia comercial, social y ecológica (Grinsted y Bennett, 1988).

2.3.2. Propiedades

Los plásmidos usualmente son moléculas pequeñas de ADN de doble cadena unidas covalentemente en cada una de sus hebras, esta naturaleza de doble cadena es de importancia fundamental, ya que a diferencia del ADN de una sola cadena o del ARN, estos plásmidos son más estables y la doble cadena indica dos copias de información, esto les asegura la permanencia del material genético en casos de que el material sea dañado en algunos procesos, es por ello que son circulares, cerrados y sin extremos libres. La hélice de ADN presenta menos giros que una molécula lineal (1 giro por cada 10.5 pares de nucleótidos). Los plásmidos, son estables a fuerzas físicas como en líquidos, no se atrapan fácilmente, por esto se pueden separar del ADN cromosómico sin ningún problema.

La habilidad o propiedad de estos elementos para transferirse de una bacteria a otra, le permite obtener mayor variabilidad genética y con ello desarrollar nuevas herramientas de supervivencia. Se han descrito tres procesos naturales de transferencia de la información presente en el material genético de las bacterias: Conjugación, Transducción y Transformación (Sigee, 1993).

2.3.3. Propiedades conferidas a sus hospedantes

2.3.3.1. De resistencia

Los plásmidos que determinan la resistencia a antibióticos (Plásmidos R) se han detectado con frecuencia en muchos géneros de la familia Enterobacteriaceae y en una gran variedad de bacterias de importancia clínica incluyendo *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas* y *Streptococcus*. Existe especificidad de los plásmidos a cierto antibiótico en particular, así, la resistencia hacia eritromicina se presenta en plásmidos de bacterias gram positivas como *Clostridium* y *Corynebacterium*, mientras que la resistencia a tetraciclinas, algunas penicilinas y aminoglicósidos se exhibe en plásmidos tanto de bacterias gram positivas como negativas. Los plásmidos también confieren resistencia a otros agentes antimicrobianos, estos incluyen iones de metales pesados como el mercurio en *Staphylococcus* y *Pseudomonas* (Thevelein, 1984), varios aniones como el arsenato y cromato en

Staphylococcus, *Streptococcus* y *Pseudomonas* (Foster, 1983) y radiación ultravioleta en *Streptococcus* y *Pseudomonas* (Tagg y Megiven, 1971).

2.3.3.2. Metabólicas

Muchos plásmidos confieren una gran variedad de propiedades metabólicas a sus hospederos, estas incluyen aquellas propiedades que son importantes desde el punto de vista de fitodiagnóstico como es el caso de la producción de H_2S que está codificado por un plásmido (Grinsted y Bennett, 1988) o utilización de lactosa (Tagg y Megiven, 1971), sacarosa y rafinosa (Schmid *et al*, 1982) o citrato (Hirato *et al*, 1986) que se presenta en miembros de las enterobacterias. Esta versatilidad metabólica les confiere la capacidad de sobrevivir en nichos ecológicos restrictivos, tal es el caso de las especies de *Pseudomonas* que usan una gran variedad de compuestos como fuente de energía y carbono (Sigee, 1993), en *Pseudomonas putida*, especialmente, esta característica está asociada con “plásmidos degradativos”. Otros compuestos que son metabolizados vía plásmidos, son las opinas (α -N-) por el plásmido Ti presente en *Agrobacterium* (Dellaporta y Pesano, 1981) y los herbicidas 2-metil-4- ácido clorofenoxiacético y bromoxinil por *Alcaligenes* (Franz y Chakrabarty, 1986) y *Klebsiella* (Stalker y McBride, 1987). Bajo algunas situaciones, la presencia del plásmido Ti, estimula la formación de agallas en los tejidos en los hospederos afectados para producir una de las tres mayores

opinas (octopina, nopalina y agropina), las cuales son fuentes de nutrientes para la bacteria (Crow, 1998).

Además existen plásmidos que determinan la producción de sustancias antibióticas. Tres tipos de sustancias están involucradas: las bacteriocinas que usualmente actúan contra bacterias relacionadas (Konisky y Nomura, 1967); los antibióticos clásicos que actúan contra un amplio espectro de bacterias (Panopoulus, 1985) y los sideróforos (Riquelme, 1996).

2.3.3.3. Fenotípicas y Simbióticas

Varios aspectos de las interacciones hospedero-parásito están controladas por plásmidos, como la producción de bacteriocinas y resistencia a antibióticos contribuyen al establecimiento del patógeno; sin embargo, existen otras propiedades relacionadas con el proceso patogénico y que están reguladas por plásmidos, tal es el caso de la infección por *Agrobacterium* (Bevan y Chilton, 1982) y la producción de toxinas por *Pseudomonas syringae* (Panopoulos y Peet, 1985). La especificidad y la habilidad de colonizar a un hospedero con diferentes fines, también está determinado por plásmidos, como lo podemos notar en el rango de hospedantes y nodulación específica de *Rhizobium* (Dénarié *et al*, 1981).

2.3.3.4. Incompatibilidad y exclusión

Algunos plásmidos son capaces de coexistir establemente en la misma línea celular, mientras que otros no lo son. Los que carecen de esta propiedad se les denomina plásmidos incompatibles, de aquí que se formen grupos de compatibilidad. Esta incompatibilidad es una característica inherente de todos los plásmidos. Se acepta generalmente que la incompatibilidad entre plásmidos refleja su similitud o distanciamiento evolutivo (Grinsted y Bennett, 1988).

En el proceso de incompatibilidad al parecer está muy involucrado el origen de replicación, esto ha sido estudiado en los plásmidos Ti, y Ri. Como era de esperarse, las regiones que controlan la replicación y la incompatibilidad de los plásmidos que codifican para la nopalina y la octopina presentan regiones homólogas. También se ha visto que una región del plásmido pMC7105 de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* correspondiente a 3.9 kb contiene el origen de replicación y una región contigua codifica para la incompatibilidad del plásmido (Panopoulos y Peet, 1985). Esta característica le permite a la bacteria seleccionar la información que ingresa a ella y obtener la que le permita aprovechar más eficientemente el nicho en que se encuentra y, por otro lado, proteger su información genética contra invasores externos.

2.3.3.5. Interacción con fagos

Los plásmidos conjugativos que portan las bacterias gram negativas determinan el filamento de la superficie, denominado pili sexual. El pili está determinado por plásmidos de un grupo en particular serológicamente relacionado y usualmente distinguible un grupo de otro (Bradley, 1980). Estas diferencias en la estructura y la morfología se reflejan en la especificidad de absorción de ciertos fagos, los cuales determinan la especificidad sexual o donador específico, y los receptores presentes en el pili sexual.

En muchas bacterias, se han descrito plásmidos que interfieren con la propagación de los fagos y al parecer se encuentran implicados muchos mecanismos, los más comunes tienen que ver con efectos en la transcripción del fago (Laemmli, 1979) o traslación (Hayes, 1968) o en efectos más generales de la función celular (Murillo, 1996).

2.3.4 “Curando” a las bacterias de plásmidos

Las poblaciones bacterianas que portan una cantidad determinada de plásmidos presentan una segregación normal de estos; sin embargo, puede ocurrir que se forme un plásmido como resultado de un error en el proceso de replicación o partición de la bacteria o que pueda perder algún plásmido en este proceso, pero debido a que los plásmidos no codifican funciones vitales para el crecimiento bajo esas condiciones, la bacteria, no se ve afectada, así, la

bacteria puede adquirir propiedades específicas (como poder degradar algún compuesto). Esta propiedad inestable puede ser común o no de una especie, y nos indica que está involucrado un plásmido. Algunas propiedades de este tipo incluyen los cambios en la morfología colonial, pigmentación, resistencia contra agentes antimicrobianos y la producción de antibióticos de varias capacidades metabólicas (Grinsted y bennett, 1988).

Tomando en cuenta esta propiedad inestable de los plásmidos, las bacterias pueden ser tratadas con agentes que curan, es decir, que eliminan sus plásmidos. Estos incluyen agentes físicos y químicos (Cuadro 1.) que afectan el ADN, interfiriendo específicamente con la replicación, o afectan algún componente estructural en particular de la enzima bacteriana. La eficiencia de curación varía de un 0.1 a un 100%, dependiendo del plásmido y de la bacteria. Existen agentes que interfieren directamente con la replicación de la bacteria como ocurre con el tratamiento con calor para ciertos plásmidos sensibles a este factor (Terawaki *et al*, 1967) o el curado del plásmido F por acridinas o bromuro de etidio (Grinsted y Bennett, 1988). Los antibióticos coumarínicos (coumermicina, noboviocina y clorobiocina) , inhiben la subunidad B de la ADN girasa, esto para moléculas superenrolladas dependientes de esta enzima (Bradley, 1980).

Cuadro 1. Ejemplos de agentes para curar plásmidos bacterianos¹

Acido nalixídico	Espermina	Imipramina
5-Amino acridina	Etil metano sulfonato	Dodesil sulfato de sodio
Acriflavina	Nitrosoguanidina	Miracil D
Atabrina	Ni ²⁺ y Co ²⁺ 17	Mitomicina C
Azul de metileno	Noboviocina	Naranja de acridina
Berberina	Penicilina	Timidina
Bromuro de etidium	Propidium	Tilorona
Clorobiocina	Proflavina	Trimetoprim
Cloroquina	Quinacrina	Hidrocloreuro de guanidina
Clorpromazina	Quinina	Fluorodeoxiuridina
Coumercina	4-Quinolona	Urea
Daunomicina	Rifampicilina	Sarkomicina
		Radiación U. V.
		calor

¹ Tomado de Grinsted y Bennett (1988)

Los compuestos intercalantes con el ADN como el naranja de acridina y el bromuro de etidio son los más comúnmente usados ya que son muy efectivos contra una gran variedad de plásmidos de muchas bacterias, que incluyen a las enterobacterias (Grinsted y Bennett, 1988), *Clostridium* (Hayes, 1968), *Bacillus* (Bernhard *et al*, 1978) y *Rhizobium* (Dénarié, 1981). La mitomicina C, es un agente que se usa para curar a *P. putida* y especies relacionadas (Grinsted y Bennett, 1988).

Biagi y Azebedo (1997), trabajando con cepas fitopatógenas de *Pseudomonas* y dos de *Erwinia*, todas productoras de bacteriocinas, determinaron que al ser sometidas a diferentes tratamientos con bromuro de etidio, la producción del inhibidor variaba dependiendo del hospedante y concentración de bromuro; sin

embargo, la propiedad de producir bacteriocinas se conservó, aún después de someterlas a altas temperaturas y de conservar la cepa por tres años, estos resultados los llevó a la conclusión de que la información genética para la codificación de las bacteriocinas de estas bacterias no esta regulada por plásmidos.

De igual forma, Fujii *et al* (1997), estudiando a la cepa YAA de *Acinibacter* que tiene la capacidad de usar anilina y o-toluidina como fuente de carbono y energía, determinaron que esta cepa cuenta con diferentes plásmidos y al ser curada con naranja de acridina, los resultados mostraron que la utilización de la anilina se encuentra codificada por un plásmido y el cluster JM109 del ADN total del plásmido de YAA involucrado en la oxidación de la anilina fue clonado en *Escherichia coli* de tal forma que las cepas recombinantes, contenían un fragmento de 18.5 Kb y mostraban una coloración amarilla en las cajas de petri que contenían anilina, lo que indicaba la formación de 2-semialdehído hidroximuconico a partir de anilina. Estos resultados sugieren que la cepa YAA degrada la anilina vía catecol a través del metabolismo de anillos de benceno por genes codificados por plásmidos.

Feng *et al* (1997), mencionan que la cepa bacteriana CF06 mineraliza tanto el grupo carbonilo como los anillos aromáticos del insecticida carbofuran y es capaz de utilizar al carbofuran como única fuente de carbono y nitrógeno. Esta cepa bacteriana fue aislada de suelo del Estado de Washington, y fue caracterizada como *Sphingomonas* sp. CF06. Este agente contiene cinco

plásmidos, y al realizar experimentos de curación con temperaturas de 42°C, se notó que la bacteria era incapaz de crecer usando al carbofuran como única fuente de carbono, lo que indico que se requieren los plásmidos para el metabolismo del carbofuran.

Un ejemplo típico del de uso de agentes que curan los plásmidos lo constituye *A. tumefaciens*, bacteria que ocasiona la agalla de la corona en una amplia variedad de plantas dicotiledóneas, esta ataca especialmente a los miembros de la familia rosácea como manzano, peral, melocotón, cerezo, almendro, frambueso y rosál. El papel central de los plásmidos fue fácilmente demostrado por experimentos de "curación", ya que haciendo crecer a esta bacteria cerca de su temperatura máxima (aproximadamente 30°C), se noto una pérdida de la patogenicidad y por consiguiente desaparición del plásmido Ti. Los estudios indicaron que las bacterias libres de plásmidos son completamente funcionales y si a las bacterias curadas se les introducía el plásmido, eran capaces de expresar su genotipo, así mismo si se introduce el plásmido Ti en *Rhizobium*, éste puede formar agallas (Anónimo, 1998).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material biológico.

Se empleo la bacteria antagónica CAE-01 y la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ambas de la colección del Laboratorio de Fitobacteriología de la Universidad Autónoma Chapingo. Las cepas fueron crecidas en el medio LB suplementado con ampicilina, cicloheximida y tetraciclina (Apéndice 7.1).

3.2. Proteína.

Esta fue donada por el laboratorio de Fitobacteriología de la Universidad Autónoma Chapingo en extractos liofilizados.

3.3. Caracterización Física y Química.

3.3.1. Termoestabilidad.

Para determinar la estabilidad térmica de la proteína. Esta fue sometida a diferentes temperaturas (40-121°C) y diferentes tiempos (1, 3, 7 y 15 minutos)

3.3.2. Contenido de Nitrógeno.

La determinación del contenido de nitrógeno se realizó por el método descrito por Plummer (1973). Para ello se tomaron 5 ml de una solución proteica en buffer TE y se le adicionaron 2 ml de H_2SO_4 . Posteriormente, se calentó por 20 horas. Después se destiló por 30 minutos y luego se le agregaron ácido bórico, y 10 ml de NaOH al 40% y se cuantificó con HCl 0.01 N.

3.3.3. Contenido de Fósforo.

La proteína purificada (1 ml), se incorporó a un tubo de ensaye con una solución de ácido perclórico al 60%. Con objeto de comparación, se formó una curva estándar con fósforo inorgánico (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 μg /tubo) en presencia de 0.5 ml de una solución de ácido perclórico al 60%. Los tubos preparados, se sometieron a digestión a 190-200°C por 20-30 minutos en una mufla tipo P Selecta (0-1200° C). Todos los tubos se enfriaron y se les adicionó peróxido de hidrógeno libre de fósforo al 30%. Nuevamente se sometieron a digestión durante 15 minutos, los tubos se enfriaron y se les adicionó una solución que contenía molibdato de amonio al 5%, ácido 1,2,4-amino naftol sulfónico al 0.2%, bisulfito de sodio al 12% y sulfito de sodio al 2.4%, para finalmente aforarlo a 1 ml con agua destilada. Se preparó la curva estándar y las lecturas se realizaron a 690 m μ . Finalmente se calculó la

cantidad de fósforo presente en la proteína usando la curva estándar del punto anterior (Plummer, 1973).

3.3.4. Peso molecular.

El peso molecular de la bacteriocina de la cepa antagonica se determinó por extrapolación con la ayuda de una curva comparativa de una serie de proteínas usadas como marcadores de peso molecular (Sigma, M-4038), estas proteínas se sometieron al igual que la proteína inhibidora a una electroforésis. Los pesos moleculares reales de las proteínas empleadas como marcador molecular fueron; Miosina 205,000; β -Galactosidasa 116,000; Fosforilasa b 97,000; Fructosa-6-fosfato cinasa 84,000; Albúmina 66,000; Glutámico deshidrogenasa 55,000; Ovoalbúmina 45,000 y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con 36,000 Daltones.

3.3.4.1. Electroforésis en geles de poliacrilamida

Se usó la metodología reportada por Maniatis *et al* (1989), para lo cual se realizó lo siguiente;

- 1).- Se montó el contenedor del gel de poliacrilamida
- 2).- Se prepararon 10 ml de gel de corrimiento (Apéndice 7.2.1) al 10% y se depositó sobre el contenedor de geles, previa desgasificación con una bomba de vacío durante 10 minutos.

- 3).- A este gel de corrimiento, se le adicionó una capa de isobutanol y se dejó en reposo hasta que solidificó
- 4).- Cuando el gel solidifico, se descartó el isobutanol.
- 5).- Se prepararon 5 ml de gel de poliacrilamida de empaquetamiento al 10% (Apéndice 7.2.2) y antes de solidificar se colocó el peine sobre el gel de corrimiento y se vació el gel y nuevamente se dejó solidificar.
- 6).- Una vez solidificado el gel, se preparó la cámara de electroforésis y se colocó el gel y se le adicionaron 250 ml de buffer de corrimiento (Apéndice 7.2.3)
- 7).- Se mezclaron 8 μ l de muestra con 7 μ l de buffer de carga (Apéndice 7.2.4) y se colocaron en los posos del gel (15 μ l/poso).
- 8).- Se terminó de complementar la cámara de electroforésis y se le adicionó el buffer de corrida restante (250 ml). La electroforésis se efectuó a 180 volts por 3 horas.
- 9).- Pasado el tiempo de corrimiento del gel, quedo listo para la tinción.

La Detección de las proteínas se realizó con la técnica descrita por Plummer (1989), la cual involucra las siguientes etapas;

- 1).- Las proteínas se fijaron al tratar el gel de poliacrilamida con cinco volúmenes de una mezcla de Etanol-Ácido acético-Agua por 12 horas a temperatura ambiente y con ligera agitación.
- 2).- La solución fijadora se decantó y luego se agregaron cinco volúmenes de etanol al 30%, se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación leve.

- 3).- El paso anterior se repitió una vez más
- 4).- Posteriormente, el etanol se desechó y se le adicionaron diez volúmenes de agua desionizada
- 5).- El paso 4 se repitió una vez más
- 6).- Se descartó el agua y se agregaron cinco volúmenes de una solución de nitrato de plata al 1% (Apéndice 7.2.5.1), y el gel se incubó a temperatura ambiente por un lapso de 30 minutos con agitación suave.
- 7).- El nitrato de plata se descartó y el gel se lavó con agua desionizada durante 20 segundos.
- 8).- Se adicionó solución reveladora de carbonato de sodio (Apéndice 7.2.5.1) y formaldehído, y se agitó hasta que las bandas aparecieron. Cuando esto ocurrió la reacción se paró con ácido acético (Apéndice 7.2.5.3).
- 9).- Finalmente el gel se lavó con agua desionizada.

3.4. Caracterización genética.

3.4.1. “Curando “ a las bacterias de plásmidos.

La curación de los plásmidos se efectuó por el método de Boucher *et al*, (1988), el cual consiste en tratar a la cepa bacteriana con naranja de acridina y bromuro de etidio. Empleando para ello; 20, 50, 100, 200 y 250 $\mu\text{l/ml}$. Los tubos en los cuales se realizaron los ensayos, fueron incubados por 16 horas a 30°C. posteriormente, se tomó 1% del inóculo anterior y se pasó a un nuevo tubo con

la adición del agente que cura plásmidos en la misma concentración, esto se repitió una vez más e incubaron por 16 horas a 30°C. Este proceso se repitió en cinco ocasiones más y finalmente cada uno de los tubos se analizaron para determinar su contenido de plásmidos.

Una vez realizado el proceso anterior, a las bacterias tratadas se les probó su actividad antimicrobiana contra *C. m. subsp. michiganensis* por el método de inhibición en placa.

3.4.2. Aislamiento de Acidos Nucleicos.

El aislamiento de los ácidos nucleicos de la cepa antagónica se realizó por el método de Marmur (1961), para lo cual se emplearon cultivos bacterianos de 24 horas de incubación, desarrolladas en el medio de cultivo STE (Apéndice 7.4). Estos cultivos se centrifugaron a 13,000 RPM y posteriormente se realizaron dos lavados con solución salina STE (Apéndice 7.5.2). Al ADN centrifugado se le adicionaron 15 ml de Tris-EDTA (TE) más 2 mg/ml de lizosima (Apéndice 7.5.1), y se incubó a 37°C por 24 horas. A continuación, se le adicionó 0.1 ml de SDS gota a gota y con agitación. Posteriormente se calentó a 60°C durante 10 minutos. Se dejó enfriar y se le adicionó lentamente cloruro de sodio, hasta obtener una concentración de 1 M, posteriormente se le adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico frío por 30 minutos, con agitación cada 5 minutos. Posteriormente la emulsión se centrifugó 15 minutos a 13.000 g a 4°C. En este paso, se detectó la formación de dos fases

con una capa blanquecina en la interfase. La fase superior se recuperó cuidadosamente y se colocó en un vaso de precipitado. A continuación, se le adicionaron 2 volúmenes de etanol, y se dejó reposar por 15 minutos en un baño de hielo, al cabo de este tiempo se centrifugó a 13,000 RPM durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó y el ADN se resuspendió con 2 ml de TE.

3.4.3. Purificación de plásmidos.

La purificación de plásmidos se realizó con el método de Maniatis *et al* (1989). El ADN purificado se mezcló con 3 ml de LiCl 5 M y se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó un volumen igual de isopropanol y la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 10,000 RPM a temperatura ambiente.

El ADN, se resuspendió en 500 µl de TE a pH 8 y luego se le agregaron 500 µl de NaCl 1.6 M con Peg 8000 al 13% (w/v) y la mezcla se centrifugó a 12,000 g por 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante se desechó y el ADN se disolvió en 400 µl de TE a pH 8 y la solución se extrajo dos veces con etanol (etanol/cloroformo y cloroformo).

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionaron 100 μ l de acetato de amonio 10 M y luego 0.2 ml de etanol y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. EL ADN se recuperó por centrifugación a 12,000 g durante 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante se deshecho y el ADN se disolvió con 200 μ l de etanol al 70% a 4°C, agitándolo en vortex y se centrifugó a 12,000g por 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el ADN se resuspendió en 500 μ l de TE pH 8.

3.4.4. Electroforésis en geles de agarosa.

El gel de agarosa empleado fue de acuerdo a las recomendaciones de Maniatis *et al* (1989). El procedimiento a seguir fue;

1).- La agarosa al 1% (Apéndice 7.3) se disolvió en agua desionizada estéril y se calentó a 95°C hasta que quedó disuelta. Posteriormente se dejó enfriar aproximadamente a 45°C y se le agregó formaldehído y bromuro de etidio (Apéndice 7.3.1). Esta mezcla se vació en el recipiente en el cual se colocó previamente el peine y el gel se dejó enfriar.

2).- Se tomaron 20 μ l de la muestra del ADN purificado, y se colocaron en tubos eppendorf a los cuales se les adicionaron 50 μ l de la solución desnaturizante

- (Apéndice 7.3.2). Estas muestras se colocaron en baño María a 60°C durante 10 minutos.
- 3).- Las muestras se sacaron del baño María y se colocaron inmediatamente en hielo.
- 4).- A estas muestras se les agregó 3 µl de buffer de carga (Apéndice 7.3.3)
- 5).- Se montó la cámara de electroforésis y se le agregó buffer de corrimiento (Apéndice 7.3.4.) hasta cubrir los posos del gel.
- 6).- Se colocaron 15 µl de muestra en cada poso, se completó el buffer TE y se conectó a la fuente de poder (60-70 volts/2 Horas)
- 7).- Cuando el frente de corrimiento (Azul de bromofenol) alcanzó aproximadamente 3/4 partes del gel, se apagó la fuente de poder, se sacó el gel y se lavó con agua destilada.
- 8).- Finalmente, los ácidos nucleicos se visualizaron con un transiluminador.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización Física y Química.

4.1.1. Comportamiento de la bacteriocina al calor.

La bacteriocina soportó 7 minutos a 100°C. Dicha propiedad ha sido ampliamente reportada para este tipo de sustancias, por ejemplo la colicina D (*E. coli*), G (*Pasteurella*) y E (*Shigella sonnei*) presentan una gran estabilidad a 100°C, sin embargo, otras como el tipo B son destruidas a 60° por 30 minutos (Reeves, 1972). Es importante mencionar que esta capacidad se ve afectada por algunos factores como son: la pureza de la proteína, el pH del medio en el cual es ensayada y las condiciones o tratamientos empleados para su purificación. Por ejemplo, la colicina E2 es estable a 65°C cuando se encuentra en caldo nutritivo y a un pH de 7.6; sin embargo, en un medio basal, esta proteína pierde su actividad a los 60 °C (Mayr-H *et al*, 1972).

Es fundamental conocer la estabilidad de este tipo de proteínas para su manipulación en el laboratorio y sobretodo para valorar su aplicación práctica como este caso en particular, para el control biológico de enfermedades bacterianas en plantas.

4.1.2. Contenido de Nitrógeno y Fósforo

El contenido de fósforo expresado en porcentaje de la proteína antimicrobiana fué de 1.15, de acuerdo a la extrapolación de la curva estandar (Fig. 3). Dicho resultado fue similar al reportado por otros autores para este tipo de moléculas; por ejemplo, la colicina K cuenta con un 1.4 % de fósforo, colicina E2 menos del 1%, colicina V-K357 2.02 y megacin A-216 menos del 0.5% (Grindsted and Bennett, 1988; Holland, 1961)

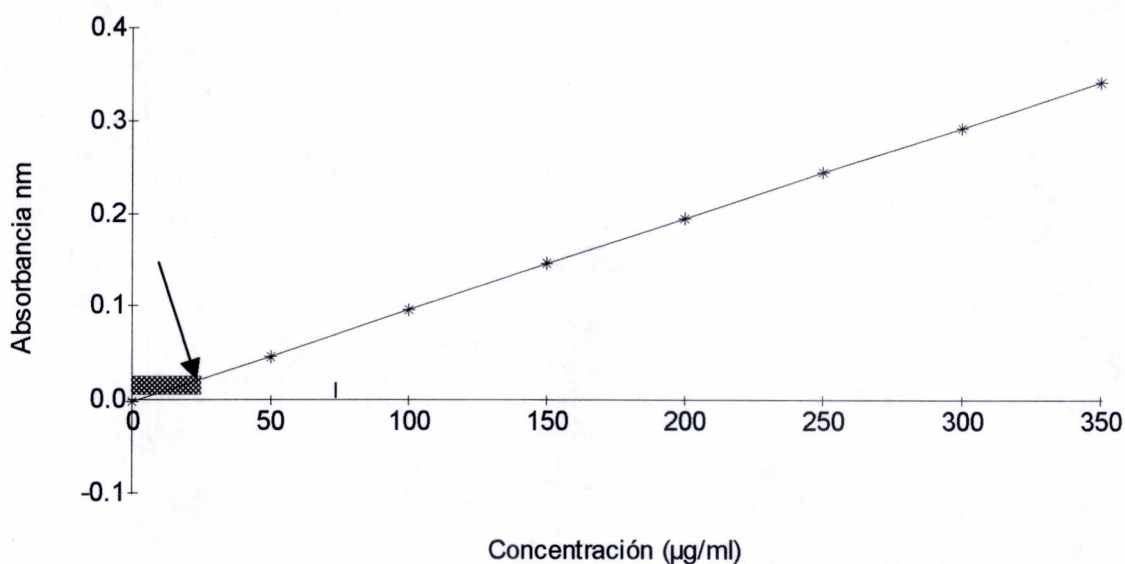


Fig. 3. Curva de calibración empleada en la determinación de fósforo de la bacteriocina.

El contenido de nitrógeno de la bacteriocina de la cepa antagónica CAE-01 fue de 14.9 % . Esta propiedad no es tan constante en los diferentes tipo de bacteriocinas, pero sí nos ayuda para describir la naturaleza de la molécula. Holland (1961), describe que la bacteriocina megacin A-216 presenta un 15.4 % de nitrógeno.

4.1.3. Peso molecular de la bacteriocina

Cuando la bacteriocina purificada fue analizada por electroforésis en gel de poliacrilamida con dodesilsulfato de sodio y de acuerdo a los corrimientos de los marcadores de peso molecular empleados presentó una banda entre los 84 y 97 KD (Fig. 4) y al aplicar el análisis descrito por Laemmli (1979) el cual toma como referencia el RF del marcador molecular. se determinó que la proteína tiene 87.9 kilodaltones (Fig. 5) siendo similar al de otras bacteriocinas previamente descritas como en el caso de la colicina D, sintetizada por *E. coli* (Mayr-H *et al* , 1972).

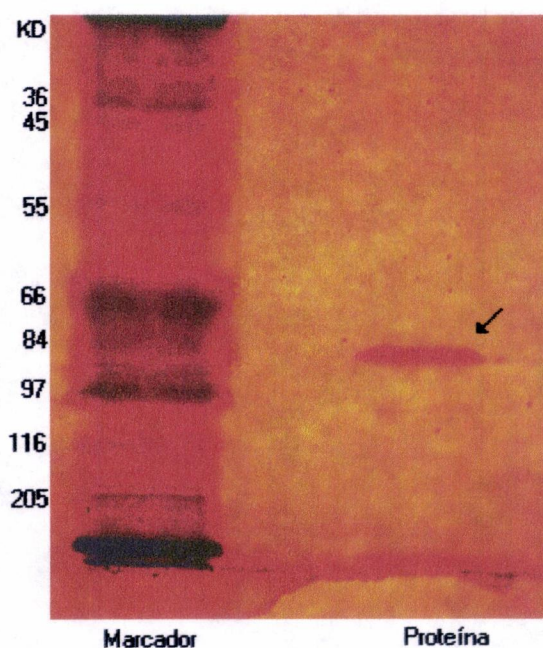


Fig. 4. Electroforésis en gel de poliacrilamida-dodesilsulfato de sodio al 10% de la bacteriocina purificada con sulfato de amonio. La columna de la izquierda corresponde a los pesos de las proteínas de referencia

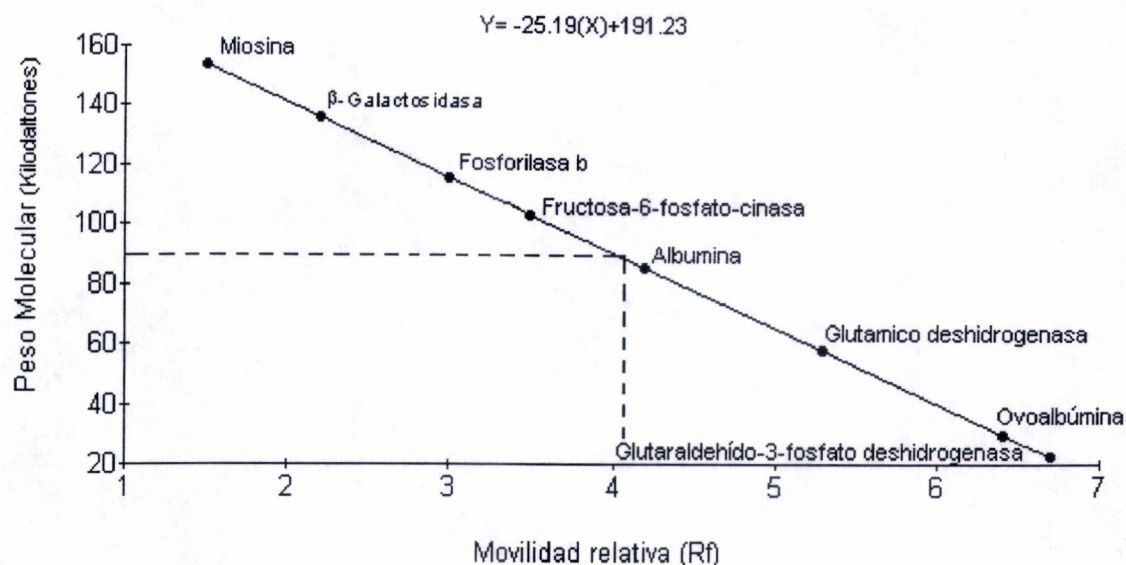


Fig. 5. Curva de calibración de marcadores de peso molecular obtenidas en geles de poliacrilamida en presencia de dodesil sulfato de sodio(SDS-PAGE) empleada para estimar el peso molecular de la proteína antimicrobiana.

4.2. Caracterización genética de la bacteriocina

4.2.1. Tratamiento de la cepa antagonica CAE-01 con naranja de acridina y bromuro de etidio para la eliminación de plásmidos.

Cuando la cepa antagonica fué expuesta a las cinco concentraciones de bromuro de etidio y naranja de acridina no se afectó su capacidad de producir la bacteriocina que inhibe el crecimiento de *C. m. subsp. michiganensis* y de acuerdo con lo señalado por Grinsted y Bennett (1988) estas sustancias son consideradas como los agentes curativos de plásmidos de mayor eficacia, por lo que al someter a la cepa antagonica a estos productos el efecto inhibitorio debió ir disminuyendo gradualmente al incrementar las concentraciones de estos agentes (Cuadros 2 y 3) o incluso que el halo de inhibición se fuera reduciendo conforme se incrementara el número de generaciones. En la Figura

6, se aprecia que aún cuando la cepa CAE-01, se hizo crecer en concentraciones de 100 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de naranja de acridina mantuvo su poder inhibitorio, lo cual corrobora que la información genética que regula la información genética de esta proteína no radica en plásmidos, ya que Boucher *et al* (1988), señalan que concentraciones de naranja de acridina por arriba de los 200 $\mu\text{g/ml}$, no sólo eliminan los plásmidos, sino que son tóxicas para las bacterias, impidiendo su crecimiento.

Cuadro 2. Halo de inhibición (cm) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por la cepa antagonica en presencia de bromuro de etidio.

Inhibición por la cepa antagonista en presencia de bromuro de etidio.				
Dosis ($\mu\text{g/ml.}$)	Halo de inhibición (cm)			Media
	R e p e t i c i o n e s			
	1	2	3	
20	0.7	1.5	1.5	1.2
50	1.0	1.4	1.7	1.3
100	1.7	1.7	1.6	1.6
200	1.1	1.2	1.3	1.2
250	0.8	1.3	1.1	1.1
Testigo	1.6	1.4	1.6	1.5

Cuadro 3. Inhibición (cm) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por la cepa antagonica en presencia de naranja de acridina.

Dosis ($\mu\text{g/ml.}$)	Halo de inhibición (cm)			M e d i a
	R e p e t i c i o n e s			
	1	2	3	
20	1.4	1.1	1.1	1.2
50	1.1	1.6	1.6	1.4
100	1.6	1.6	1.5	1.5
200	1.1	1.6	1.3	1.3
250	1.5	1.7	1.4	1.5
Testigo	3.9	4.1	3.8	1.5

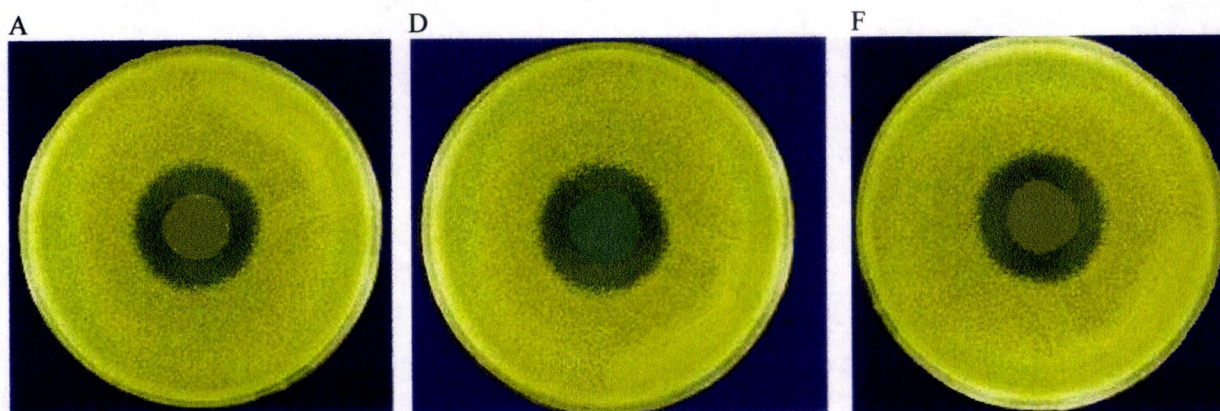


Fig. 6. Inhibición *in vitro* de la cepa antagonica CAE-01 sobre *C. m.* subsp. *michiganensis* mostrando los tratamientos; (A) testigo, (D) 100 y (F) 250 $\mu\text{g/ml}$ de naranja de acridina.

En la figura 7, se muestran los resultados de la electroforésis de los ácidos nucleicos de la cepa antagonica CAE-01 después del tratamiento, donde se puede observar el ADN total (Carril 2) que presenta un peso molecular aproximado de 11,000 pb. Este peso molecular es característico de todos los ADNs (Dellaporta,1981). Lo que sobresale es que conforme incrementa la

concentración de naranja de acridina y bromuro de etidio la cantidad de ADN plasmídico disminuye hasta desaparecer completamente (Carril 8); sin embargo, la eliminación de este ADN no afectó su actividad antimicrobiana (Fig. 6), sugiriendo que esta propiedad no está regulada por plásmidos. Este resultado concuerda con lo mencionado por Murillo y Rodríguez-Palenzuela (1996) que indican que la producción de bacteriocinas, así como algunas toxinas y la resistencia a ciertos productos en ocasiones involucra al ADN plasmídico, pero en otras, está bajo el control del genoma bacteriano como ocurre con la cepa PT23 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, la cual contiene los genes *cop* (resistencia a cobre) en un plásmido, mientras que *Pseudomonas cichorii* los contiene en el genoma y *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae* en plásmidos o en el genoma.

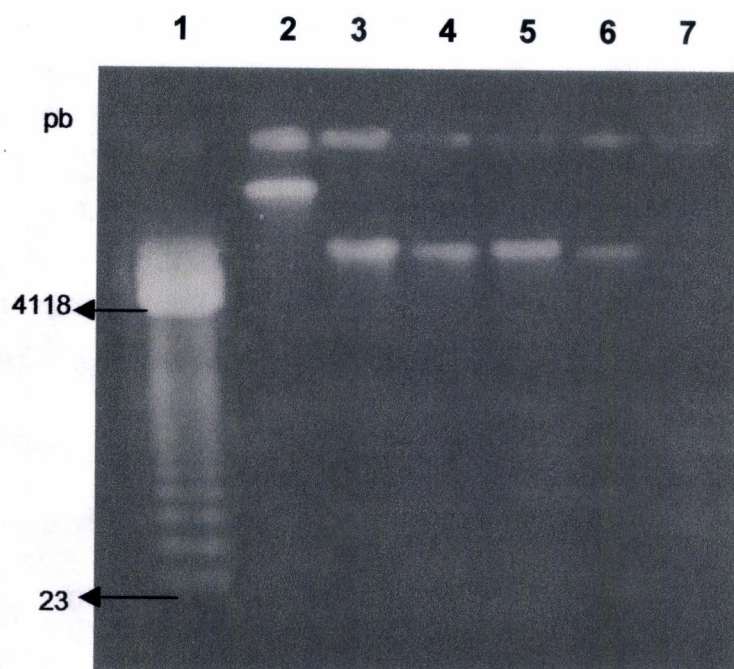


Fig. 7. Electroforésis en gel de poliacrilamida-dodesilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de la fracción de los ácidos nucleicos de la cepa antagonica CAE-01. El carril 1 corresponde al marcador molecular, el carril 2 a los ácidos nucleicos totales de la cepa sin tratar y en los carriles 3, 4, 5, 6 y 7 corresponden al ADN plasmídico obtenido después del tratamiento con el naranja de acridina a las concentraciones de 20, 50, 100, 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo se puede inferir que:

1. La bacteriocina, tiene un peso molecular de 87.9 KD.
2. La bacteriocina presenta una alta termoestabilidad ya que soporta temperaturas de 100°C durante 7 minutos.
3. La bacteriocina tiene 1.15% de fósforo y 14.9 de nitrógeno
4. La codificación de la bacteriocina producida por la cepa antagónica CAE-01 no reside en el ADN plasmídico.

6. LITERATURA CITADA

- Anónimo.** 1998: <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/course-info/third>
- Basurto** R., C. Xoconostle B., M. Alvarez A. 1990. "Programación genética de plantas e insecticidas". ICYT. México, D.F. Vol. 12. pp 166-167.
- Bernhard**, K., H. Schrempf., and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Journal. Bacteriology. 133: 897-903.
- Bevan**, M. W., and M. Chilton, D. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri Plasmids. Annual Review Genetic. 16: 357-359.
- Biagi**, C.M.R., y Azebedo J. L. 1997. Eliminacao da producao de bacteriocins em *Erwinia* E *Pseudomonas* fitopatogenicas. Scientia Agricola. Vol 52, 1
- Boucher**, C.A., P. Barberis, A. and A. Arlat. 1988. Acridine Orange Selects for Deletion of *hrp* Genes in All Races of *Pseudomonas solanacearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 1: 282-288.
- Bradley**, D. E. 1980. Ultraestructure of bacteriocins. Plasmid. 4:155-169.
- Crow**, 1998: <http://helios.bto.edu.ac.uk/bto/course-info/third>
yr/micro3m/crown.htm#crest
- Dellaporta**, S. I., and R. Pesano, I. 1981. Biology of the Rhizobiaceae. International Review Cytology Supplement. 13: 83-104.

- Dénarié, J., P. Boistard., and F. Casse-Delbert.** 1981. Nodulation of *Rhizobium*.
In: Biology of the Rhizobiaceae. International Review Cytology
Supplement. 13: 225-256.
- Ellis, J. G., A. Kerr., M. Van, M., and J. Schell.** 1979. "Agrobacterium: Genetic
studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall".
Physiological Plant Pathology. 15: 311-19.
- Feng, X., L-T. Ou., and A. Ogram.** 1997. Plasmid-mediated mineralization of
carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. Applied and Environmental
Microbiology. 63: 1332-1337
- Foster, T. J.** 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and
toxic metal ions in bacteria. Microbiology Review. 47: 361-409.
- Franz, B., and A. Chakrabarty, M.** 1986. A treatise on Structure and Function.
In: The bacteria. Academic Press. Sokatch J. R. and Ornston L. N. Edit.
New York. Vol. X, pp. 295-317.
- Fravel, D. R.** 1988. "Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease". Annual
Review Phytopathology. 26: 75-91.
- Fujii, T., M. Takeo., and Y. Maeda.** 1997 Plasmid-encoded genes specifying
aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. Microbiology. 143:
93-99.

- Gijón** H. A. R. 1996. "Etiología de la pudrición del nopal (*Opuntia* spp.) y su comportamiento con la cepa antagónica CAE-01". Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 50 p.
- Grinsted**, J. and P. Bennett, M. 1988. Plasmid technology. In: Methods in microbiology. 2da edición. Academic Press. Inc. San Diego, CA. Vol. 21. 335 p.
- Hayes**, W. 1968. The genetic of bacteria and their viruses. Blackwell, Oxford. 2ª ed. 197 p.
- Hirato**, T., N. Ushiguro., M. Shinagawa., and G. Sato. 1986. Conservation of DNA sequences for plasmid-mediated citrate utilization with the enterobacteria. Journal Bacteriology. 165: 324-327.
- Holland**, J. B. 1961. The purification and proprieties of megacin, a bacteriocin from *Bacillus megaterium*. Journal Biochemistry. 78: 641-48.
- Kerr**, A., and K. Htay. 1973. "Biological control gall through bacteriocin production". Physiologycal Plant Pathology. 4: 37-44
- Klement**, Z., K. Rudolph., and D. Sands, C. 1990. Methods in phytobacteriology. Académiai Kiadó, Budapest. pp. 216-217.
- Konisky**, J., and M. Nomura. 1967. Interaction of colicins with bacterial cell. Specific alteration of *Escherichia coli* ribosomes induced by colicins E3 *in vivo*. Journal Molecular Biology. 26: 181-95.

- Laemmli**, U. K. 1979. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 277: 680-85.
- Larkin**, R. P. 1998. <http://www.ars-grin.gov/ars/Beltsville/bacrc/psi/bpd/bpdl.html>
- Liao**, C. H. 1989. "Antagonism of *Pseudomonas putida* strain pp22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent". *Plant Disease*. 73: 223-6.
- Maniatis**, T., E. Fritsch, F., and J. Sambrook. 1989. "Molecular cloning, A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y. Vol. 1. p. 6.
- Marmur**, J. 1961. "A procedure for the isolation of DNA from microorganisms". *Journal Molecular Biology*. 3: 208-218.
- Mayr-H**, A., A. Hedges, H., and R. C. Berkeley, W. 1972. Methods for studying bacteriocins,. *In: Methods in microbiology*, J. R. Norris and D. W. Ribbons (Ed). Vol. 7A, Academic Press, Inc. New York. pp. 315-422
- Mejía** S. D y Ma de L. Rodríguez M. 1998. Estudios preliminares del modo de acción de la cepa antagónica CAE-01 (No publicado)
- Murillo** J. y P. Rodríguez-Palenzuela. 1996. Biología molecular de las interacciones entre las plantas y bacterias fitopatógenas. *In. Patología Vegetal*. Llácer, G; López, M. M; Trapero, A. y Bello, A. (Ed.). Phytoma. España. pp. 559-586.

- Panopoulos**, N. J. and R. Peet, C. 1985. The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids. Annual Review Phytopathology. 23: 381-419
- Plummer**, T. D. 1973. An introduction to practical biochemistry. Mc Gram Hill. London. pp, 112-113.
- Reeves**, P. 1972. The bacteriocins. Springer-Verlag New York. p. 139
- Riquelme**. 1996. <http://morgat.udg.es/microbsen/v1204-96/02Riquelme.html.253p15md.rtf>
- Rodríguez** M. Ma. de L., Gijon H. Y D. Mejía S. 1995. "Antagonismo de una cepa avirulenta de *Erwinia tracheiphila* CAE-01 sobre *Erwinia atroseptica*, causante de la pudrición del nopal (*Opuntia* sp.)". In: Resúmenes del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa, Zihuatanejo, pp.73.
- Rodríguez**, M. Ma. de L; y D. Mejía S. 1995. "Aislamiento de bacterias antagonicas a bacterias fitopatógenas". In: Resúmenes del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa, Zihuatanejo. pp.57.
- Schmid**, K., M. Schupfner., and R. Schmitt. 1982. Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. Journal Bacteriology 151:68-76
- Sigee**, C. D. 1993. "Bacterial Plant Pathology. cell and molecular aspects". Cambridge University press. Great Britain. pp. 278-313.

- Stalker, D. M. and K. McBride, E.** 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *Journal Bacteriology*. 169: 955-960
- Tagg, J. R. and A. Megiven, R.** 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiology*. 21: 943.
- Terawaki, Y., H. Takatsu., and T. Akiba.** 1967. Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. *Journal Bacteriology*. 94: 687-690
- Thevelein, J. M.** 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiology Review*. 48: 43-48.
- Vidaver, A. K.** 1983. Bacteriocins: the lure and the reality. *Plant Disease*. 67: 471-5.
- Watanabe, T. and T. Fukasawa.** 1962. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. IV. Interactions between resistance transfer factor and F-factor in *Escherichia coli* k12. *Journal Bacteriology*. 83: 727-35.

7. APENDICE

7.1. Medio para crecimiento de las bacterias LB 10X (Luria-Bertanni).

	g/100 ml
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Ampicilina	0.02
Cicloheximida	0.02
Tetraciclina	0.02

7.2. Reactivos para electroforésis en poliacrilamida

7.2.1. Preparación del gel de corrimiento al 10%

H ₂ O	4 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	3.3 ml
1.5 M tris (pH 8.8)	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
Persulfato de amonio 10%	0.1 ml
TEMED	0.002 ml

7.2.2. Preparación del gel de empaquetamiento al 10%

H ₂ O	1.4 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%	0.33 ml
1. M tris (pH 6.8)	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de amonio 10%	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

7.2.3. Buffer de corrimiento (TE)

	G/l
50 mM Tris, pH 8	6.055
10 mM EDTA	3.722

7.2.4. Reactivos para la tinción con plata.

7.2.4.1. Solución de plata

AgNO ₃	0.1 g
Agua	Aforar a 100 ml

7.2.4.2. Solución reveladora

Carbonato de sodio	2.5 g
Formaldehído	0.02 g
Agua	Aforar a 100 ml

El formaldehído se le adiciona al momento de usarse.

7.2.4.3. Solución para detener la reacción

Acido acético	1 g
Agua	Aforar a 100 ml

7.3. Reactivos para la Electroforésis en Gel de Agarosa.

	0.7%	1.0%	2.0%
Agarosa	1.05 g.	1.5 g.	3.0 g.
TAE 20X	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
H ₂ O dd	142.5 ml	142.5 ml	142.5 ml
Volumen Total	150.0 ml	150.0 ml	150.0 ml

7.3.1. Solución de tinción.

Bromuro de etidio	0.1 g/ml
H ₂ O	1 ml

7.3.2. Solución desnaturalizante

Formamida	500 μ l
Formaldehído 37%	162 μ l

7.3.3. Buffer de carga

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilen-cianol	0.25%
Ficoll 400	15 %

7.3.4. Buffer de corrimiento (TE).

	g/l
50 mM Tris, pH 8	6.055
10 mM EDTA	3.722

7.4. Buffer para la resuspensión de las bacterias centrifugadas (STE).

	G/100 ml
100 mM NaCl	0.5850
10 mM Tris HCl pH 8	0.1211
10 mM EDTA	0.3722

Se pesa el Tris y se disuelve en 80 ml de agua destilada. El pH se ajusta a 8.0 con HCl. Se disuelve el EDTA en 10 ml de agua destilada con unas gotas de NaOH. Este no se disolverá si el pH es inferior a 8.

7.5. Varios

7.5.1. Solución de lisozima

1M tris-HCL, pH 8	5 ml
0.5 M EDTA	2 ml
Lisozima	0.5 g
	H ₂ O destilada hasta 100 ml

7.5.2. Buffer STE

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl. pH 8
1 mM EDTA

