

Temas de actualidad

Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables

Manuel Ferrer

CSIC, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Campus Cantoblanco, 28049 Madrid.
E-mail: mferrer@icp.csic.es

Avances en Microbiología: del cultivo directo a las genotecas

La diversidad microbiana es una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos. Sin embargo, los métodos tradicionales de cultivo de microorganismos han limitado el análisis a aquellos que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio. Por tanto, uno de los retos más importantes de la microbiología y biotecnología actuales es el estudio de toda esta diversidad. El aislamiento directo de DNA de una determinada muestra nos permite el acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables. La clonación de todo este DNA genómico (el "metagenoma") en complejas genotecas, puede constituir una herramienta importante en la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas de interés industrial y medioambiental. Conseguir de forma colectiva todos los genomas microbianos presentes en un determinado hábitat es un objetivo de los programas de descubrimiento de nuevas enzimas y encaminado a la utilización de estos recursos, evitando el problema asociado al cultivo tradicional.

Diversidad microbiana como fuente de nuevas enzimas

Existe en la actualidad una gran demanda de productos y procesos biotecnológicos. Los procesos catalizados por enzimas representan una alternativa a los procesos químicos convencionales, bien porque se produce un menor número de subproductos, o bien porque son procesos más selectivos hacia el producto de interés. La dependencia actual de productos derivados del petróleo, y la tendencia a la utilización de otras fuentes de carbono (menos contaminantes) para obtener energía y productos de interés farmacéutico, clínico y alimentario, entre otras, abren nuevas expectativas a una química verde dominada por la biotecnología. Sin embargo, el desarrollo de nuevos productos y procesos está limitado a las enzimas

que se conocen hasta la fecha. En la actualidad se conocen aproximadamente 4.300 enzimas (secuenciadas), de las que 300 están comercializadas. Estas a su vez se han utilizado en multitud de procesos, encaminados a la obtención de productos de alto valor añadido, por ejemplo, biopolímeros formados por unidades de amino ácidos o azúcares, compuestos quirales con actividad biológica, bioetanol y biodiesel, etc.; sin embargo, la fuerte demanda de nuevos productos con actividad biológica que impera en la sociedad, requiere la búsqueda de nuevas enzimas.

Si bien las propiedades y actividades de las enzimas conocidas pueden ser modificadas mediante técnicas de ingeniería de la reacción (mezclas de disolventes, inmovilización, modificación química, diseño de enzimas semisintéticas, etc.) o ingeniería del biocatalizador (evolución molecular dirigida, diseño combinatorio y computacional, mutagénesis dirigida y saturada, etc.), éstas parten de enzimas cuyas estructuras y actividades son conocidas, lo que limita a priori el diseño de novedosos procesos enzimáticos. Estudios recientes han demostrado que el número de proteínas (enzimas) existentes en el Universo (físico), asumiendo una longitud media de 200 amino ácidos, puede ser de 20^{200} , de las cuales se conocida actualmente una mínima parte (Koonin *et al.*, 2002). En este punto, la biodiversidad presente en nuestro planeta, en particular la microbiana, es la fuente mayor de recursos biotecnológicos, y por otro lado es la menos desarrollada (Handselman *et al.*, 1998). Los métodos tradicionales para obtener nuevos biocatalizadores por cultivo directo de cepas puras de microorganismos es una estrategia estándar y potente, todavía en uso (Ogawa y Shimitzu, 1999). De esta forma, grandes compañías, como BASF, tienen una amplia colección de microorganismos que utilizan como productores no sólo de biocatalizadores, sino también de metabolitos de alto valor añadido. Sin embargo, la biosfera está dominada por los microorganismos y la mayoría no han sido aún estudiados (Whitman *et al.*, 1998).

El desarrollo de métodos moleculares aplicados

a la ecología microbiana ha permitido estimar que la diversidad existente en la naturaleza se encuentra entre 10^5 y 10^7 especies (siendo el concepto de especie en procariotas más amplio que en eucariotas; Roselló-Mora y Amann, 2001). Su importancia radica en el papel clave del mundo procarionta en las transformaciones bio-geoquímicas que ocurren en la naturaleza. Se estima que sólo el 1% de los microorganismos han sido cultivados y caracterizados, dejando una gran cantidad de ellos (más de 10.000 especies diferentes) sin explorar (Tabla 1). El desconocimiento de esta enorme diversidad es una de las carencias más importantes que ha tenido el estudio de la Biología, Microbiología y Enzimología. Se puede decir que los métodos tradicionales para el cultivo de los microorganismos han limitado nuestro análisis a los que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio (Pace, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). Estas limitaciones han dado lugar a un surgimiento de nuevas técnicas de Biología Molecular, basadas en el aislamiento de todo el ADN genómico y encaminadas principalmente al (i) estudio de la diversidad microbiana a un nivel genético, mediante la extracción directa del ARN o DNA, y su posterior análisis, y (ii) a la puesta en marcha de programas de secuenciación de microorganismos.

Análisis de ARN y ADN y su utilización en la identificación y discriminación de microorganismos

La composición de comunidades microbianas complejas se ha estimado principalmente de acuerdo a la diversidad de las secuencias de DNA que codifican los rRNA que forman parte de las subunidades del ribosoma, existiendo en la actualidad una enorme base de datos. Todo ello las convierte en útiles herramientas identificadoras y

filogenéticas mediante técnicas de *Genetic Fingerprint* (huella genética) (Muyzer, 1999). Esta técnica proporciona un perfil de la diversidad microbiana basándose en la separación física de especies únicas de ácido nucleico. La estrategia general consiste en: primero, extracción de ácido nucleico (DNA o RNA) de una muestra dada; segundo, amplificación de genes que codifican el rRNA 16S y tercero el análisis de los productos de PCR en una electroforesis sometida a un gradiente desnaturante bien con urea o bien de temperatura (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*; DGGE, o *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*; TGGE) (Muyzer *et al.*, 1993; Heder *et al.*, 2001; Villadas *et al.*, 2002).

Con la identificación de organismos por técnicas genotípicas se ha puesto de manifiesto la existencia de un gran número de microorganismos, tanto más diferentes, en cuanto a la complejidad del ADN extraído y ha permitido mostrar el potencial genético "ilimitado" de recursos de los microorganismos no-cultivables, sin que su cultivo en el laboratorio sea necesario (Amman *et al.*, 1995; Borneman y Triplett, 1997). Así, por ejemplo, se estima que más de un 80% de los amplificados presentan una identidad inferior al 90% con secuencias descritas en las bases de datos, siendo además la mayoría de las homologías descritas frente a bacterias no cultivables presentes en otras muestras. Además, estudios recientes indican que los ambientes extremos (suelos tropicales, fondos marinos, fuentes termales, terrenos contaminados, ambientes acidófilos, alcalófilos o halófilos, etc.), se encuentran entre los ambientes de mayor diversidad microbiana descrita (Borneman y Triplett, 1997; Whitman *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2001). Esto se debe fundamentalmente a la presencia de elementos móviles en microorganismos que contribuyen a la plasticidad y al poder adaptativo que da lugar a esta diversidad. Hoy en día estos elementos constituyen una

Tabla 1. Número de especies estimadas (y accesibles) en la Naturaleza.

Organismo	Especies estimadas	Accesibilidad (% del total)
Animales (mamíferos, aves, peces)	$3,5 \times 10^4$	>90
Artrópodos/invertebrados	10^6-10^7	10
Nemátodos	5×10^5	3
Plantas superiores	$2,7 \times 10^5$	>90
Algas	10^4-10^5	70
Hongos	$1,5 \times 10^6$	5
Bacterias	10^4-10^5	1-10
Arqueas	10^5-10^6	0,1-1
Virus	10^5-10^6	4

herramienta molecular de primer orden en la identificación y discriminación de cepas bacterianas.

Programas de secuenciación de microorganismos

Desde el primer genoma bacteriano secuenciado (*Haemophilus influenzae*, 1995) se ha publicado la secuencia de más de un centenar de microorganismos y existen nuevos proyectos en marcha. El primer microorganismo secuenciado se eligió de acuerdo a su importancia médica. Este enfoque se ha ido ampliando a otros microorganismos y en la actualidad ya están disponibles los genomas de bacterias modelo importantes en otras áreas de la biología tanto básicas como aplicadas. Una de las principales utilidades de los genomas es su utilidad como fuente de procesos y productos. Sin embargo, la secuenciación total de un genoma es un proceso caro y costoso como estrategia de búsqueda de nuevas actividades, por lo que se hace necesario el desarrollo de estrategias más directas. Es en este punto donde las genotecas metagenómicas representan una alternativa reciente y de gran proyección como fuente de información genética de organismos tanto cultivables como no cultivables.

Metagenoma: DNA como fuente de recursos biotecnológicos

Los métodos actuales para el descubrimiento de nuevas enzimas se basan fundamentalmente en conseguir de forma colectiva todos los genomas microbianos presentes en un determinado hábitat y su posterior clonación en complejas genotecas. Handelsman y colaboradores (1998) han creado el término "metagenoma" para definir este DNA. El DNA de todo un conjunto de microorganismos es extraído de una fuente natural (terrestre o acuática) y puesto en complejas genotecas de DNA recombinante para subsiguientes protocolos de búsqueda (*screening*). Esta estrategia es factible y está teniendo un gran impacto en la literatura reciente (Cottrell *et al.*, 1999; Henne *et al.*, 2000; Rondon *et al.*, 2000; MacNeil *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2003; Schloss y Handelsman, 2003; Eggert *et al.*, 2004). A pesar de los enormes recursos derivados de la diversidad molecular presente en un DNA metagenómico, el número de actividades enzimáticas novedosas es todavía limitado, probablemente debido a problemas tecnológicos y logísticos derivados de (i) la utilización de métodos de búsqueda adecuados y (ii) el éxito en la clonación de los fragmentos de ADN (Handselman *et al.*,

1998). Es por ello que el éxito de estos métodos depende en gran medida de la capacidad de clonar fragmentos de DNA suficientemente grandes en los vectores apropiados y de su capacidad para expresar la información genética en hospedadores heterólogos de forma eficiente (Rondon *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2001) y la búsqueda de protocolos adecuados de *screening*. Optimizando ambos factores, se han podido encontrar nuevas moléculas funcionales con una homología de secuencia en el rango 0–40% a cualquier gen publicado en las bases de datos (Lorenz *et al.*, 2001). Los aspectos más destacados de las técnicas metagenómicas son (i) el acceso al gran reservorio genético (metagenoma) de los microorganismos no cultivables y (ii) la identificación de genes y enzimas novedosas que pueden trasladarse a nuevas aplicaciones biotecnológicas. La Figura 1 muestra de forma esquemática las diferencias entre trabajar con ADN de organismos individuales y ADN metagenómico para el aislamiento de nuevas enzimas. A grandes rasgos, el potencial de éste último radica en que se puede trabajar con genomas de entre 1 y 15.000 organismos (la mayoría de ellos no cultivables) y 10^5 – 10^9 clones/día.

Genotecas metagenómicas: información genética vs. funcional

La creación de genotecas metagenómicas puede realizarse bien para obtener el máximo grado de información genética o bien para obtener enzimas o proteínas con un alto grado de expresión y funcionalización. Desde este punto de vista conviene señalar tres tipos de genotecas:

1) Genotecas en plásmidos, cósmidos y/o fósmodos. Una de las estrategias más directas para la clonación del DNA metagenómico, lo constituyen la utilización de plásmidos, cósmidos y fósmodos utilizando, normalmente, *E. coli* como huésped heterólogo (Lorenz *et al.*, 2003). Estas genotecas se basan en la clonación directa de fragmentos de DNA de pequeños (3–10 kbp: plásmidos) o grandes (15–120 kbp: cósmidos o fósmodos) fragmentos de DNA en *E. coli*. Aunque presentan problemas asociados al nivel de expresión y toxicidad celular (durante la expresión génica), éstas se han demostrado útiles para la búsqueda de una alta variedad de enzimas: 4-hidroxitirato dehidrogenasas, lipasas, esterases, proteasas, amilasas, oxigenasas, oxidorreductasas, etc. (Lorenz *et al.*, 2003).

2) Genotecas de cromosomas artificiales. Una de las estrategias para la clonación de fragmentos de DNA se basa en la construcción y

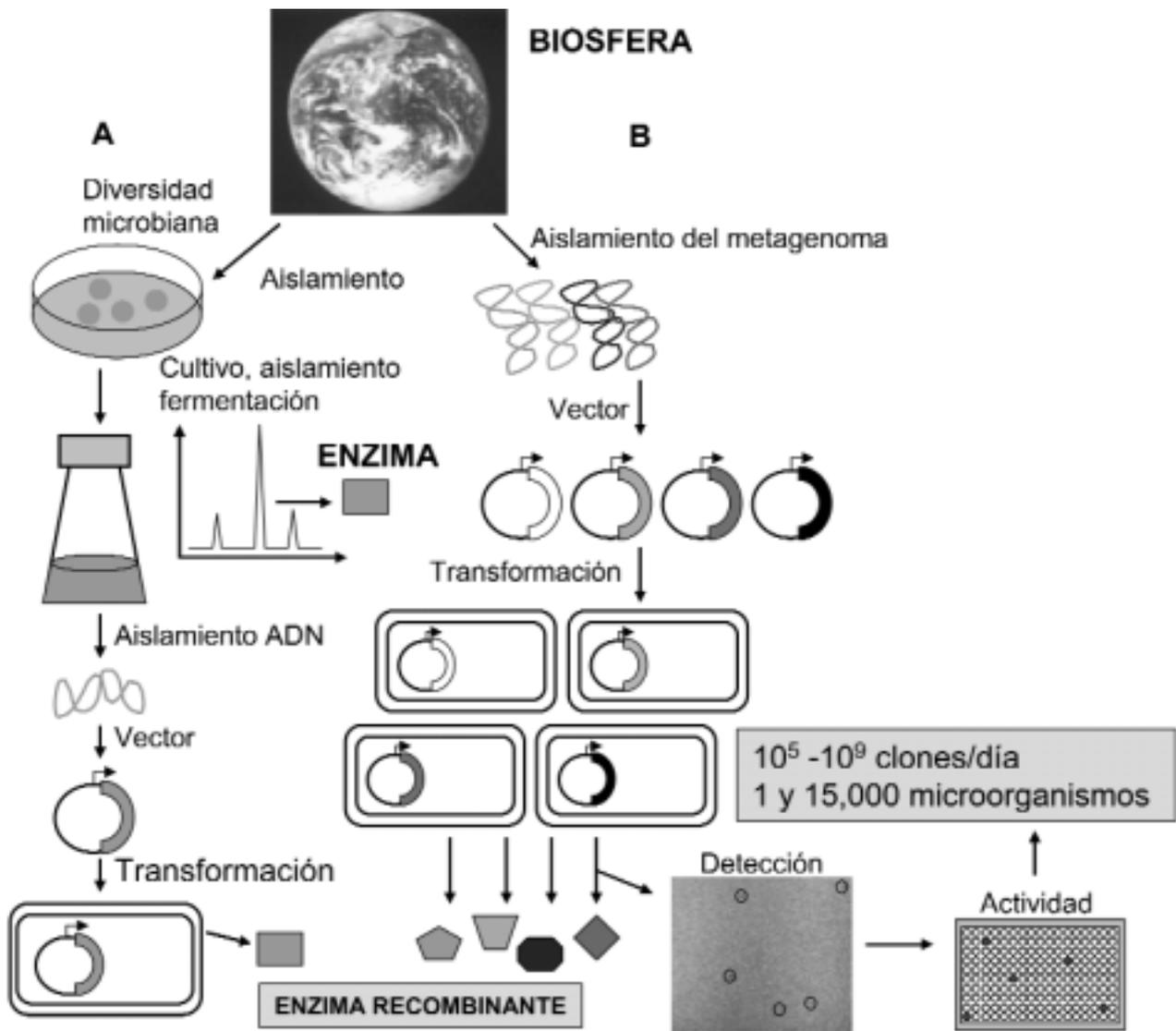


Figura 1. Obtención de enzimas recombinantes a partir de ADN de organismos puros (A) o a partir de ADN metagenómico (B). (Lorenz *et al.*, 2000).

expresión en *E. coli* de genotecas de cromosomas artificiales bacterianos (*Bacterial Artificial Chromosome Library*) conteniendo fragmentos de DNA genómico (5–120 Kpb) aislado directamente de los microorganismos de un ecosistema particular: el metagenoma. El escrutinio de estas genotecas para la identificación de metabolitos o enzimas de interés ha permitido encontrar toda una lista de actividades enzimáticas descubiertas: lipasas, esterases, amilasas, proteasas, oxidoreductasas, L-amino ácido oxidasas, hidroxilasas, dioxigenasas, nucleasas, quitinasas, xilanasas, etc (Gillespie *et al.*, 2002; Rondon *et al.*, 2000). Para una representación lo más completa posible del metagenoma de una muestra de suelo, por ejemplo, se ha estimado que se necesitan unos 10⁶ clones de cromosomas artificiales bacterianos con un tamaño de inserto medio de 100 kb (Handselman

et al., 1998). Genotecas de este tamaño no son fáciles de construir, ni de conservar, así como tampoco de realizar búsquedas de actividades enzimáticas concretas. Estos vectores replican como copia única en *E. coli* y pueden mantener de forma estable insertos de hasta 300 kb (Kouker y Jaeger, 1987). En la actualidad hay descritos vectores BACs mejorados capaces de aceptar grandes insertos permitiendo genotecas genómicas más completas (MacNeil *et al.*, 2001). Esta estrategia de búsqueda incrementará, en un futuro próximo, el gran número de compuestos naturales relevantes por su aplicación industrial. La construcción de genotecas en cromosomas artificiales (*BAC-libraries*) permite que junto con un adecuado sistema de *screening* lo suficientemente selectivo pueda usarse como estrategia de acceso a nueva información genética de microorganismos cultiva-

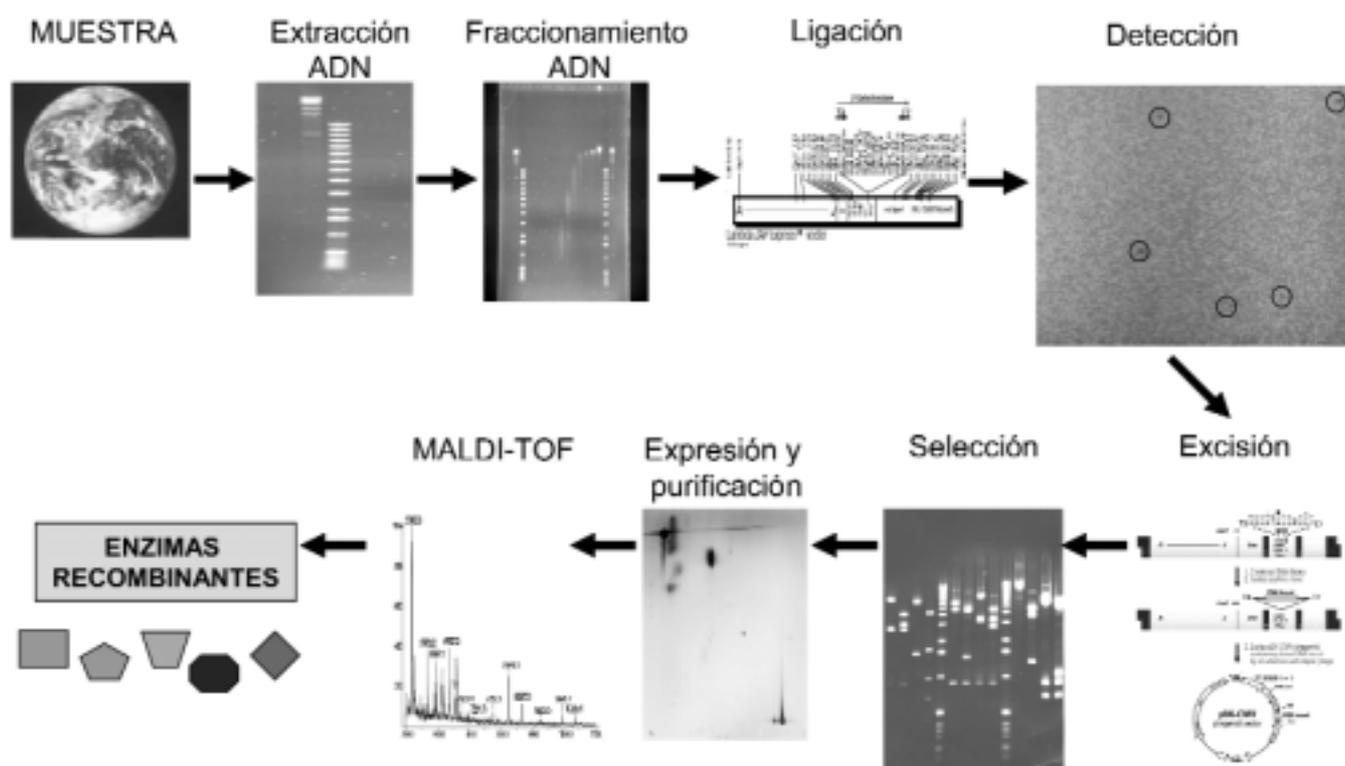


Figura 2. Metodología para el aislamiento de nuevas enzimas a partir de genotecas metagenómicas creadas en fagos *lambda*.

bles o no presentes en un determinado nicho.

3) Genotecas en fagos *lambda*. Aunque las genotecas en BACs proporcionan una gran información genómica, su principal inconveniente derivada de la baja expresión que, en ocasiones, se

produce de un determinado gen localizado en un fragmento de DNA de gran tamaño (> 20–30 Kpb). Este problema puede ser resuelto mediante la expresión en fagos utilizando vectores *lambda* capaces de aceptar insertos de hasta 12 Kb tanto de procariotas como de eucariotas. La ventaja de este sistema, es una alta expresión de la actividad deseada, así como la facilidad de construcción y posterior expresión en un huésped, por ejemplo, *E. coli* (ver Figura 2). El escrutinio de genotecas *lambda* ha permitido encontrar nuevas enzimas: lipasas, esterases, endoglucanasas, amilasas, ciclodextrinasas, oxidoreductasas, lacasas, quitinasas, DNAsas, etc. (Cottrell *et al.*, 1999; Ferrer *et al.*, no publicado).

Genotecas metagenómicas: metodología

Debido a la inherente fragilidad del DNA, el aislamiento de pequeños o grandes fragmentos con los que construir la genoteca del metagenoma exige la utilización de protocolos secuenciales capaces de separar las muestras de DNA por diferentes propiedades físico-químicas, así como en distintos tamaños (Mac Neil *et al.*, 2001). Una vez determinadas las muestras así como las condiciones de extracción de un DNA de suficiente calidad se comienza la construcción de la(s) genoteca(s),

Manuel Ferrer es Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Granada y Doctor en Química por la Universidad Autónoma de Madrid. Realizó su Tesis Doctoral sobre utilización de lipasas comerciales y aisladas de hongos filamentosos para la síntesis de ésteres de azúcares y ácidos grasos bajo la dirección del Prof. A. Ballesteros Olmo y del Dr. F.J. Plou Gasca, y una estancia postdoctoral en el Departamento de Microbiología del Prof. K.N. Timmis en el *National Research Center for Biotechnology* (GBF), Alemania, donde estudió la búsqueda de nuevas enzimas de interés industrial y medioambiental a partir de genotecas metagenómicas y la modificación de la temperatura de crecimiento de organismos mediante la expresión de chaperonas de organismos psicrófilos. En 2003 se incorporó al Departamento de Biotecnología aplicada del Instituto de Catálisis (CSIC) de Madrid donde es Investigador del Programa "Ramón y Cajal". Su investigación actual se centra en el descubrimiento de enzimas de microorganismos no cultivables utilizando herramientas metagenómicas, así como, la adaptación molecular, funcional y estructural de enzimas aisladas de ambientes extremos.

que tendrá que hacerse, naturalmente, en un huésped heterólogo, esencialmente *E. coli*, *Bacillus* sp. o *Streptomyces lividans*. Como material de partida se necesita la mínima cantidad de muestra de la que se pueda aislar mediante protocolos establecidos entre 200 y 500 mg de DNA total con fragmentos de DNA del metagenoma del mayor tamaño posible (entre 50 y 200 Kb). Hasta 1Gbp de DNA del metagenoma presente en las muestras (el genoma medio de un microorganismo ronda los 3–4 Mbp), gran parte de él representado por fragmentos de microorganismos no cultivables, con una media de tamaño de inserto superior a las 30 kb (BACs) o inferior a 20 kb (fagos *lambda*), es sometido a continuación a procesos de búsqueda enzimática. Evidentemente el aislamiento de nuevas enzimas conlleva el desarrollo de 8 nuevos sistemas de screening, bien sea para la búsqueda de nuevas enzimas de amplio espectro de reactividad, o bien enzimas selectivas o específicas, punto este último que requiere la puesta a punto de sustratos más específicos (ver Figura 3).

Futuro de las herramientas metagenómicas: cohesión con técnicas tradicionales

Los hechos arriba expuestos auguran la existencia de nuevas enzimas en distintos ecosistemas. La búsqueda de estas enzimas puede ser combinada con técnicas de evolución dirigida, herramienta, que se ha mostrado muy eficaz para el desarrollo de nuevas actividades partiendo de enzimas ya conocidas (Alcalde, 2003). Esta técnica consiste en incrementar o variar las propiedades de un biocatalizador mediante ciclos sucesivos de mutagénesis aleatoria o recombinación del DNA. De esta forma se consigue acortar el proceso de la selección natural desde miles de millones de años hasta tan sólo semanas o meses de trabajo en el laboratorio. Si esta herramienta se combina con la diversidad enzimática aún sin explorar, nos podemos encontrar en una situación ventajosa que implicaría un avance sustancial en la Biotecnología y Microbiología actuales. Proyectos conjuntos que contemplen (i) el desarrollo de nuevos métodos de cultivo de microorganismos; (ii) el descubrimiento de nuevas enzimas a partir de todos los genomas de organismos (metagenoma) de una muestra y (iii) su posterior mejora mediante técnicas de evolución dirigida o ingeniería de la reacción y del biocatalizador (por ejemplo, técnicas de inmovilización), son por tanto proyectos ambiciosos y de gran interés, tanto de un punto de vista básico (conocimiento de nuevas estructuras y actividades), como de un punto de vista aplicado

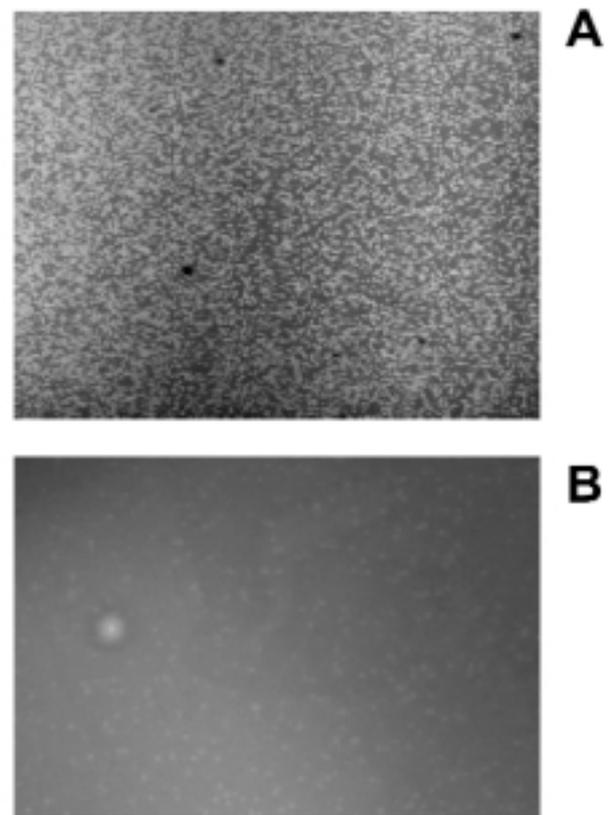


Figura 3. Detección de actividad esterasa (A) y celulasica (B) en genotecas metagenómicas.

(nuevas actividades que pueden trasladarse a una industria química verde libre de subproductos y respetuosa con el medioambiente; ver Figura 4). Éstas son, propuestas multidisciplinarias que engloban áreas tan diversas como microbiología, biotecnología, estructura de proteínas, bioquímica y química orgánica, así como en líneas de investigación emergentes, por ejemplo, genómica y proteómica.

Por último, señalar que estudios recientes reve-



Figura 4. Combinación de técnicas metagenómicas, evolución dirigida, e ingeniería del biocatalizador para el aislamiento de nuevas y mejores enzimas.

lan que el futuro de la microbiología será la creación de bancos de genes, es decir, organismos heterólogos (*E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, etc.) que expresen un gen particular que codifique una o varias enzimas con actividad determinada, obtenidas a través de búsquedas en genotecas metagenómicas (u otras herramientas similares). Estos bancos coexistirán con los bancos de microorganismos que actualmente existen (DSMZ, ATCC, etc.). La creación de estos bancos de genes será el punto de partida para acceder a la información genética, estructural y funcional de genes obtenidos de microorganismos no cultivables, cuyo potencial es ilimitado.

Bibliografía

- Alcalde M (2003) Evolución molecular dirigida. *Investigación y Ciencia* 11:69-77.
- Borneman J, Triplett EW (1997) *Appl Environ Microbiol* 63:2647-2653.
- Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL (1999) *Appl Environ Microbiol* 65:2553-2557.
- Eggert T, Leggewie C, Puls M, Streit W, Van Pouderoyen G, Dijkstra BW, Jaeger K-E (2004) *Biocatal Biotrans* 22:139-144.
- Gillespie DE, Brady SF, Betterman AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman J (2002) *Appl Environ Microbiol* 68:4301-4306.
- Handselman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman, RM (1998) *Chem Biol* 5:245-249.
- Henne A, Smith RA, Bömeke M, Gottschalk G, Daniel R (2000) *Appl Environ Microbiol* 66:3113-3116.
- Koonin EV, Wolf YI, Karen GP (2002) *Nature* 420:218-223.
- Kouker G, Jaeger KE (1987) *Appl Environ Microbiol* 53:211-213.
- Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, Eck J. (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13:572-577.
- Lorenz P, Liebeton K, Niehaus F, Schleper C, Eck J (2003) *Biocatal Biotrans* 21:87-91.
- MacNeil IA, Tiong CL, Minor C, August PR, Grossman TH, Loiacono KA, Lynch BA, Phylips T, Narula S, Sundaramoorthi R, Tyler A, Aldredge T, Long H, Gilman M, Holt D, Osburne MS (2001) *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:301-308.
- Madrid VM, Aller JY, Aller RC, Chistoserdov AY (2001) *FEMS Microbiol Ecol* 37:197-209.
- Muyzer G (1999) *Curr Opinion Microbiol* 2:317-322.
- Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG (1993) *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- Ogawa J, Shimizu S (1999) *Trends Biotechnol* 17:13-21.
- Pace NR (1997) *Science* 276:734-740.
- Rondon MR, August PR, Betterman AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, LoiaconoKA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman R (2000) *Appl Environ Microbiol* 66:2541-2547.
- Roselló-Mora R, Amann R (2001) *FEMS Microbiol Rev* 25:39-67.
- Schloss PD, Handelsman J (2003) *Curr Opin Biotechnol* 14:303-310.
- Suzuki MT, Rappe MS, Haimberger ZW, Winfield H, Adair N, Strobel J, Giovannoni SJ (1997) *Environ Microbiol* 63:983-989.
- Villadas PJ, Martínez-Abarca F, Toro N (2002) *Anal Biochem* 300:101-103
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6578-6583.

El sexagésimo aniversario del ADN

Juan Carlos Argüelles

Area de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia.
30071 Murcia.

E-mail: arguelle@um.es

El pasado 6 de junio, las grandes potencias conmemoraron el 60º aniversario del Desembarco aliado en Normandía, la epopeya bélica que marcó el fin del dominio nazi en Europa y el comienzo de un nuevo orden mundial, cuya doctrina principal aún se mantiene vigente, con los Estados Unidos como nación dominante. En 1944, se produciría también un descubrimiento esencial en Biología, aunque su 60º aniversario haya pasado prácticamente desapercibido: la demostración de que el ácido desoxirribonucleico (ADN), es la molécula portadora de las instrucciones genéticas hereditarias. Para muchos expertos, este es el hallazgo científico más importante de todo el siglo XX –incluso de significación superior a la estructura de la Doble Hélice, festejada en el año 2003 con gran fasto y esplendor–, pero por increíble que parezca, estas investigaciones no merecieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina que, indudablemente, hubiera merecido.

El protagonista de aquel acontecimiento trascendental, fue un científico modesto, riguroso y paciente, Oswald T. Avery, responsable del grupo de Bacteriología residente en el Instituto Rockefeller de Nueva York. Avery trabajó durante más de diez años, en unión de un reducido grupo de colaboradores, realizando una labor intensa de comprobación y descarte hasta concluir la función clave del ADN como “principio transformante” de la herencia. Para entender la relevancia del trabajo de Avery, hay que situarse en el contexto histórico de la época. Hacia 1940, las proteínas eran las moléculas “estrella” de los seres vivos, al estar dotadas de especificidad biológica. Entonces ya se había descubierto que las enzimas, los anticuerpos, ciertas hormonas o los transportadores de membrana, eran proteínas. De modo que la comunidad cientí-

fica estaba convencida de que los genes se componían de proteínas, cuya naturaleza concreta era preciso identificar. Mientras tanto, los ácidos nucleicos se trataban como moléculas inútiles, un mero andamiaje para sostener las proteínas o una reserva celular de fosfato. De hecho, circulaba entonces la hipótesis del “tetranucleótido”, que postulaba una secuencia repetitiva y constante de las cuatro bases del ADN (adenina, guanina, timina y citosina), en todos los organismos. Por tanto, el ADN no podría contener ninguna información codificada y transmisible, condición esencial del mensaje hereditario.

Buena parte de los científicos no tomaron en cuenta la trascendental aportación de Avery, que tardó mucho en ser aceptada como cierta. Incluso, se concedió un crédito mayor a los experimentos de Hersey y Chase, implicando al ADN como elemento causal de la infección por bacteriana por fagos. Sin embargo, una vez revalidada su teoría... ¿Por qué Avery nunca recibió el reconocimiento científico que merecía? Aunque su nombre fue sugerido alguna vez, nunca figuró como candidato propuesto al premio Nobel, en una de las más lamentables equivocaciones de los científicos contra uno de sus mejores talentos.

Varias razones podrían explicar tan desgraciado olvi-

do. En primer lugar, el trabajo de Avery encaja en el concepto de “Descubrimiento prematuro para su tiempo”. La Ciencia progresa a saltos y los grandes avances conceptuales, suponen una ruptura con la doctrina oficial en boga. A menudo, son los investigadores heterodoxos, capaces de cuestionarse verdades en apariencia firmes, quienes plantean hipótesis novedosas y arriesgadas, rechazadas tajantemente por la corriente oficial establecida. En este sentido, proponer que el ADN es “el libro de instrucciones de la vida”, cuando



Oswald T. Avery en 1937 (Foto propiedad del Rockefeller Archive Center, Nueva York)

todo el mundo creía firmemente que ese papel estaba reservado a las proteínas, produjo una reacción de rechazo, cuando no de burla o descrédito. El propio Avery sufrió una dura campaña de desprestigio, acusado de que sus preparaciones de ADN, contenían proteínas contaminantes, que correspondían a los verdaderos genes.

Una segunda causa, pertenece a la categoría definible como marketing de la Ciencia. El trabajo de Avery y colaboradores se publicó en una revista que catalogaríamos como de bajo índice de impacto, el *Journal of Experimental Medicine*, de circulación frecuente entre los médicos, pero más restringida entre los científicos básicos. Las pruebas disponibles demuestran como, cinco años después de publicado el artículo, sus contenidos seguían siendo desconocidos para una buena parte de los especialistas en el área. Sin embargo, la explicación definitiva, hay que buscarla en la propia personalidad de Avery. Frente a otros científicos más vanidosos y amantes de la fama y los reconocimientos, Avery era un sencillo hombre

soltero, callado, extremadamente cauto en sus declaraciones públicas. Nunca se embarcó en giras de conferencias promocionales, no escribió libros y se negó a patentar su descubrimiento. Algunos críticos sostienen que no fue consciente de las enormes implicaciones de su investigación, pero las evidencias desmienten esta teoría.

El 6 de junio de 1944, los aliados desembarcaron a sangre y fuego en las playas normandas, comenzando la liberación de Europa del yugo hitleriano e inaugurando un tiempo nuevo en las relaciones geopolíticas del viejo continente. Ese mismo año, un descubrimiento excepcional dio inicio a la nueva era de la Biología Molecular. Sesenta años después, las reverberaciones del ADN en la Ciencia son innegables. La secuenciación de los ácidos nucleicos, la identificación segura mediante huellas genéticas, el proyecto Genoma Humano, la terapia génica o la clonación a partir de la transferencia nuclear, figuran entre los últimos logros científicos, consecuencia directa de aquel otro gran "Desembarco".

Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*

María Luisa del Río, Jesús Navas Méndez, José Ignacio Rodríguez-Barbosa,
César B. Gutiérrez-Martín y Elías F. Rodríguez Ferri

Unidad de Microbiología e Inmunología. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, León.
E-mail: dsamdg@unileon.es

Haemophilus parasuis es un microorganismo Gram negativo, de la familia *Pasteurellaceae*, cuyo hospedador natural es el cerdo. Produce la enfermedad de Glässer, que ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo y representa en la actualidad uno de los principales problemas emergentes del ganado porcino. Esta enfermedad se manifiesta de forma esporádica, asociada al estrés (en relación con traslados y cambios en el manejo) y en animales jóvenes, especialmente a los tres primeros meses de vida. La prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado durante los últimos años de forma espectacular, y generalmente se ha diagnosticado asociada al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS).

Morfológicamente *H. parasuis* se presenta como pequeños bacilos o cocobacilos Gram negativos, pleomórficos, que en ocasiones presentan filamentos superficiales semejantes a fimbrias que se pierden después del subcultivo (Figuras 1A-1B). Es dependiente del factor V de coagulación de la sangre (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD) (Figuras 1C-1D). *H. parasuis* posee actividad catalasa y oxidasa débil, pero carece de actividad ureasa. Produce ácido a partir de glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no a partir de xilosa, manitol, ramnosa, arabinosa o lactosa. No es hemolítico ni produce efecto CAMP.

La virulencia de los microorganismos patógenos, es decir, su capacidad para producir morbilidad y mortalidad, es un proceso complejo, multifactorial, que requiere la acción coordinada de muchos genes. En el caso de *H. parasuis* se desconocen muchos aspectos relativos a la virulencia. Hasta la fecha no se ha descrito la producción de toxinas, al contrario de lo que sucede con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una especie próxima, aunque si se ha señalado la presencia de una neuraminidasa y el LPS, que se relaciona con la producción de trombosis y coagulación intravascular diseminada. Un firme candidato como factor de virulencia, lo representan los sistemas de captación de hierro.

El hierro es el elemento más abundante de los metales de transición en los eucariotas y representa un factor esencial para la supervivencia de los microorganismos. En condiciones fisiológicas, en presencia de oxígeno y a pH neutro, el hierro

disponible es muy escaso, del orden de 10-12 μM , siendo necesarias concentraciones de 0,05-0,5 μM para el crecimiento y multiplicación de las bacterias. Debido a la rápida oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} y a la formación de radicales insolubles, este elemento se convierte en el componente principal de la reacción de Haber-Weiss-Fenton, catalizando la formación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. Puesto que el hierro, en combinación con el oxígeno, media la generación de estos aniones tóxicos, los microorganismos han desarrollado un mecanismo que regula los niveles de hierro para lo que se requiere, por una parte, un sistema para detectar la concentración citoplasmática de hierro, y un sistema efector (regulador) que controle la homeostasis. Normalmente, ambas funciones dependen de una proteína denominada Fur (*ferric uptake regulator*) que funciona como represora del sistema de captación de hierro, mediante la unión al ADN e inhibición de la accesibilidad de la ARN polimerasa a los promotores, cuando la concentración de hierro es suficiente; sin embargo cuando la concentración de hierro intracelular es escasa, la proteína Fur pierde su capacidad para unirse al ADN y se produce la transcripción de los

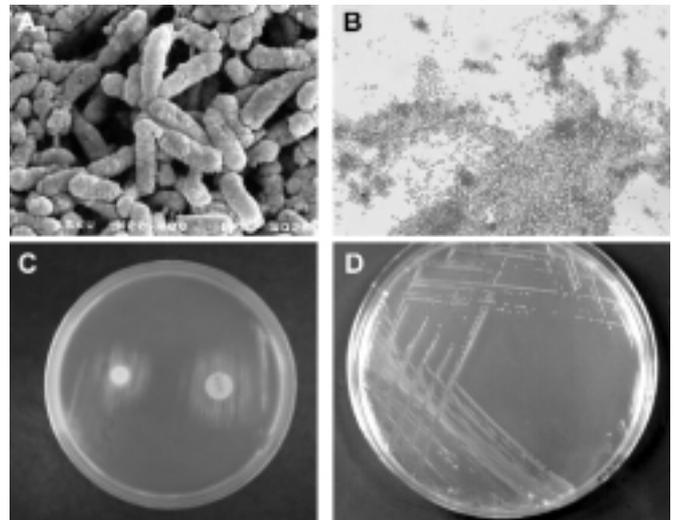


Figura 1. *H. parasuis*. A) Fotografía al microscopio electrónico ($\times 20.000$). B) Fotografía al microscopio óptico ($\times 100$) de la tinción de Gram. C) Crecimiento NAD-dependiente. D) Colonias sobre medio PPLO enriquecido con NAD.

genes que estaban reprimidos. Por tanto, para sobrevivir en el hospedador, la bacteria ha desarrollado diversos sistemas para la captación de hierro y éstos se han relacionado con la virulencia (3).

En el hospedador, la mayor parte del hierro presente se localiza intracelularmente formando complejos con metaloproteínas como la hemoglobina, mioglobina, catalasa y citocromo *c*, o almacenado como ferritina. Una pequeña parte del hierro extracelular se acompleja a proteínas transportadoras (*carrier*), entre las que figura la transferrina sanguínea y la lactoferrina de las secreciones mucosas.

Otro de los sistemas de adquisición de hierro en procariontes se basa en la afinidad por quelantes de hierro (sideróforos). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que se sintetizan en condiciones deficitarias de hierro y que son capaces de unir el Fe^{+3} procedente de complejos insolubles o de compuestos del hospedador con alta afinidad y especificidad. Posteriormente, los sideróforos cargados con hierro son transportados al interior de la bacteria donde el hierro es liberado, bien por hidrólisis de los sideróforos o por reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} .

En condiciones anaerobias, el ión Fe^{+2} es solu-

ble y puede difundir a través de porinas localizadas en la membrana externa, siendo internalizado posteriormente por un sistema FeoABC dependiente de energía. Sin embargo, en condiciones aerobias, el hierro disponible es muy escaso, por lo que las bacterias precisan de la intervención de proteínas receptoras en la membrana externa de alta afinidad por él (proteína TbpA), uniéndose así a las proteínas que unen Fe^{+3} (transferrina), facilitando posteriormente la translocación al espacio periplásmico. Desde aquí, será captado por proteínas de unión periplásmicas (proteína FbpA), para ser cedidas después a los transportadores tipo ATP que se localizan en la membrana citoplásmica (proteínas FbpBC), los cuales finalizan el proceso de internalización del hierro al citoplasma de la célula (Figura 2).

Sistemas de captación de hierro dependientes de sideróforos en *H. parasuis*

Dependiendo de su naturaleza química, los sideróforos pueden dividirse en tres grandes grupos químicos. Los catecoles (enterobactina), que contienen un anillo de catecol, los hidroxa-

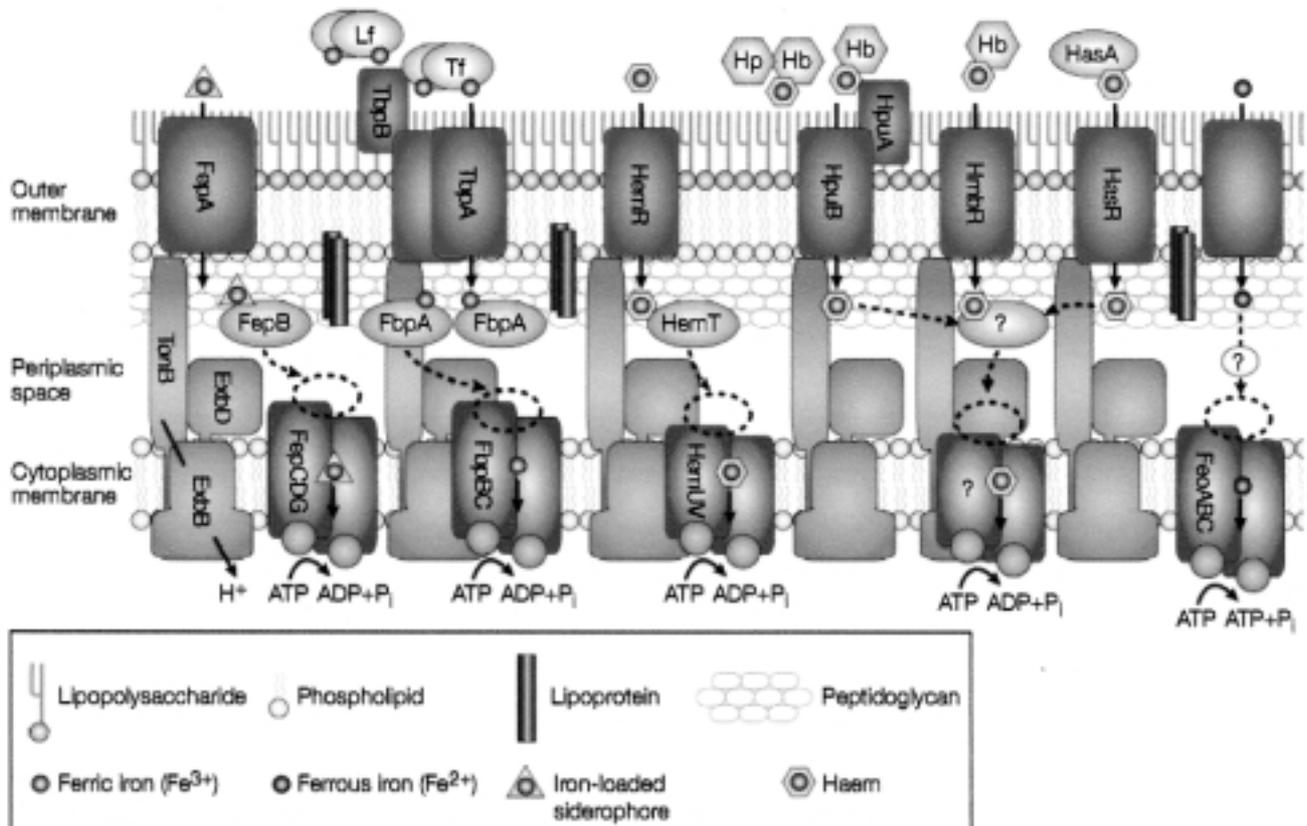


Figura 2. Esquema de la disposición hipotética de las proteínas que intervienen en la captación de hierro en bacterias Gram-negativas (3).

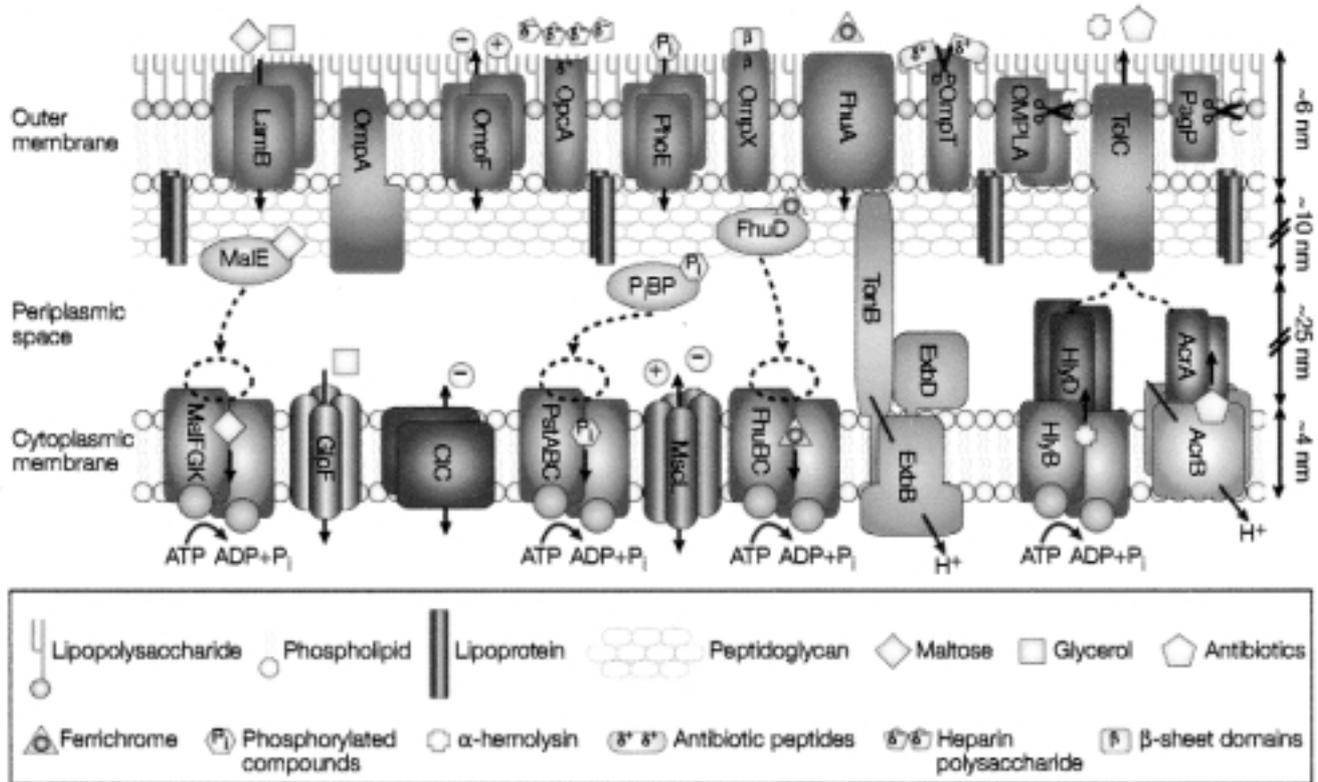


Figura 3. Esquema que muestra las funciones biológicas de las proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas (3).

matos (ferricromo), que utilizan ácidos hidroxámicos y los α -hidroxicarboxilatos representados por el citrato férrico.

El transporte, a través de la membrana externa, de nutrientes presentes en baja concentración y que son demasiado grandes para difundir a través de las porinas, debe llevarse a cabo mediante moléculas transportadoras de alta eficiencia, que interactúan con varias proteínas situadas en el periplasma y en la membrana citoplasmática. Así, los sideróforos cargados con hierro, como por ejemplo el ferricromo, son importados a través del receptor de membrana externa FhuA, unidos a la proteína de unión periplasmática FhuD, e internalizados al citoplasma mediante las proteínas FhuB y FhuC. En la Figura 3 se presenta un esquema general en el que se integran, en las bacterias Gram negativas, las proteínas mencionadas (3).

La proteína FhuA fue identificada en primer lugar como receptor de ferricromo. Más tarde se comprobó que actuaba también como receptor para los fagos T5, ϕ 80, T1 y UC-1, para la colicina M y algunos antibióticos como la albomicina (análogo estructural del ferricromo) y rifamicina CGP 4832.

La comparación de secuencias correspondientes al extremo N-terminal de tres proteínas conocidas de membrana externa de *A. pleuropneumo-*

niae (TbpA, FhuA y HgbA), que intervienen en la captación de hierro procedente de la transferrina, ferricromo y hemoglobina, respectivamente, reveló que existe una secuencia consenso en los tres genes compuesta de seis residuos de aminoácidos (TbpA, EQAVQLNDVYVTG; FhuA, QETAVLDEVS VS; HgbA QEQMQLDTVIVKD). Esta región consenso podría funcionar como sitio de interacción física (TonB box) entre algunas proteínas de membrana externa y la proteína TonB, que aporta la fuerza protón motriz necesaria para internalizar el hierro desde la membrana externa a la membrana citoplasmática.

La proteína FhuD es la responsable del transporte de ferricromo desde el receptor de membrana externa (FhuA) a la proteína FhuB que se encuentra localizada en la membrana citoplasmática. Ésta última, junto con la proteína FhuC son proteínas de membrana citoplasmática componentes de un sistema transportador ABC dependiente de energía que internalizan el hierro al interior del citoplasma.

En *H. parasuis* se ha detectado mediante PCR la presencia de los genes que intervienen en la captación de hierro mediada por proteínas de unión a sideróforos de tipo hidroxamato que forman parte de la región *fhu*. Los cuatro genes se disponen de forma consecutiva en el cromosoma

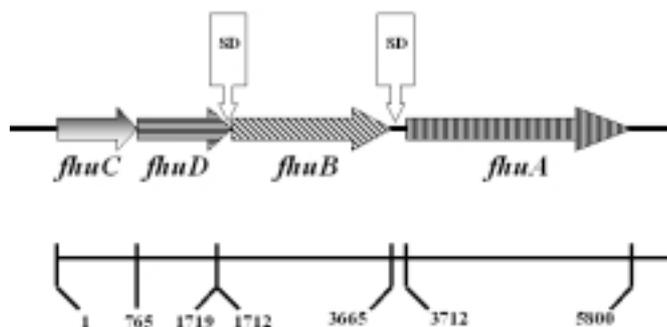


Figura 4. Disposición de la región *fhuC-fhuD-fhuB-fhuA* en *H. parasuis*, con el tamaño de cada uno de los genes. SD, secuencia de Shine-Dalgarno.

bacteriano (Figura 4), con idéntica localización a la descrita en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (*A. pleuropneumoniae*). El gen que se sitúa en primer lugar es el *fhuC*, seguido por los genes *fhuD*, *fhuB* y *fhuA*. La región tiene un tamaño de 5.800 pares de bases (pb) y a lo largo de esta secuencia no se ha encontrado ninguna secuencia consenso de promotores, ni tampoco ninguna caja Fur (4,5).

La regulación de la expresión del receptor de membrana externo FhuA no está condicionada por la concentración de hierro existente en el medio de cultivo, como hemos podido demostrar mediante la utilización de anticuerpos policlonales generados frente a la proteína FhuA de *A. pleuropneumoniae*, con la que reacciona cruzadamente. La regulación de la expresión de FhuA coincide con lo descrito en *A. pleuropneumoniae*, sin embargo en otras especies como *Escherichia coli* o *Campylobacter jejuni*, la expresión de FhuA está regulada positivamente en función de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo.

María Luisa del Río González

Es Licenciada en Veterinaria por la Universidad de León, donde también se doctoró en 2004. Ha sido becaria predoctoral en la Facultad de Veterinaria y es actualmente becaria posdoctoral en el Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" de Murcia. Ha realizado estancias en el Dpt. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el *Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen* de Hannover (Alemania), habiendo obtenido para esta última una beca FEMS para científicos jóvenes. Su actividad investigadora se ha centrado en los patógenos porcinos, fundamentalmente *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.



Ello puede ser debido, por una parte, a la ausencia de una caja Fur en la región *fhu* de *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*, que sí está presente en las regiones *fhu* de *E. coli* y *C. jejuni*. Por otra, a que la disposición de los genes en estas especies es diferente, ya que en *E. coli* y *C. jejuni*, FhuA se dispone al inicio de la región (*fhuACDB*), mientras que en *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae* la disposición es al final de la misma (*fhuCDBA*). Por tanto, se necesita conocer más a fondo la región que precede al inicio del codón de iniciación del gen *fhuC* de *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*, para la búsqueda de la región promotora en estas dos especies.

Sistemas de captación de hierro independientes de sideróforos en *H. parasuis*. Proteínas de unión a transferrina

Los miembros de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* son capaces de obtener hierro a partir de la **transferrina** y, en algunos casos, de la **lactoferrina**. En este caso, y contrariamente a lo que sucede con la captación de hierro mediada por sideróforos, la captación de hierro se produce sin la internalización de la transferrina.

La transferrina es una glucoproteína de aproximadamente 80 kDa que transporta hierro a los tejidos. Cada uno de los extremos amino y carboxilo se pueden dividir en dos dominios que flanquean un sitio de unión para una molécula de hierro y un anión bicarbonato. Cada molécula de transferrina puede unir, por tanto, dos iones de hierro de forma reversible. La síntesis de la transferrina tiene lugar fundamentalmente en el hígado y su expresión ha sido detectada también en tejidos extrahepáticos, incluyendo los linfocitos T, el cerebro y células de Sertoli. La concentración de transferrina en el suero es de aproximadamente 25 M, estando saturada de hierro solamente un 30%.

El receptor de transferrina está formado por dos proteínas localizadas en la membrana externa, denominadas Tbps (*transferrin binding proteins*), que se identificaron por primera vez en *N. meningitidis*. La mayor de ellas posee un peso molecular aproximado de 100 kDa y se denomina TbpA (antes denominada Tbp1 o TfbB), mientras que la menor presenta un peso molecular de 60 a 85 kDa y se denomina TbpB (antes denominada Tbp2 o TfbA).

La proteína TbpA es una proteína integral de membrana, TonB dependiente, que funciona como un canal a través del cual pasa la transferrina al espacio periplásmico. Una de las regiones que se

extiende hacia la membrana externa, contiene diez residuos de aminoácidos altamente conservados, de secuencia GAINIEIYEN, que se encuentran tanto en las proteínas TbpAs de *A. pleuropneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, como en las proteínas LbpAs de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Esta región conservada podría facilitar el paso de hierro libre a través del canal de la TbpA.

La proteína TbpB presenta un tamaño más variable, incluso dentro de la misma especie, aunque en todas, las variantes son más pequeñas que la TbpA, de aproximadamente 70 kDa. Se trata de una lipoproteína, ya que posee una secuencia señal delimitada por un sitio de reconocimiento para la peptidasa II, cerca del extremo N-terminal. Se localiza expuesta en la superficie de la bacteria, siendo posible la presencia de dominios transmembrana que le permitirían extenderse hacia la membrana externa. A diferencia de la TbpA discrimina entre la forma cargada y no cargada de hierro de la transferrina, presentando una elevada especificidad por la holotransferrina.

En *A. pleuropneumoniae* se ha demostrado que para que tenga lugar la internalización del hierro desde la membrana externa al interior del citoplasma se necesita que el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD proporcione el ATP necesario. Con este fin, el ATP generado en la membrana citoplasmática, es transferido a los receptores TonB dependientes en la membrana externa a través del gradiente de protones proporcionado por las proteínas ExbB y ExbD. La caja TonB asimismo es necesaria para la adquisición de energía del receptor.

Se ha demostrado anteriormente que *H. parasuis* es capaz de unir transferrina porcina pero no bovina (2). En nuestro laboratorio hemos demostrado mediante PCR la presencia de los genes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA* en todos los serotipos de *H. parasuis*, comprobando que todos ellos presentan el mismo tamaño al descrito en *A. pleuropneumoniae*, y que estos tres genes se disponen de forma consecutiva en el cromosoma bacteriano (4,5) (Figura 5). En primer lugar se localiza el gen *tonB* seguido, en este orden, por los genes *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA*. En *P. multocida*, *M. haemolytica* y *H. influenzae*, sin embargo, la disposición de los genes es diferente, puesto que el gen que se localiza en primer lugar es el *exbB*, seguido por los genes *exbD* y *tonB*. La localización de los genes *tbpB* y *tbpA* a continuación del gen *exbD* en *H. parasuis*, solamente se ha observado en el caso de *A. pleuropneumoniae* y *Actinobacillus suis*. En *Neisseria* spp., donde se han clonado los genes *exbBD*, no se ha visto que estén localizados ante-

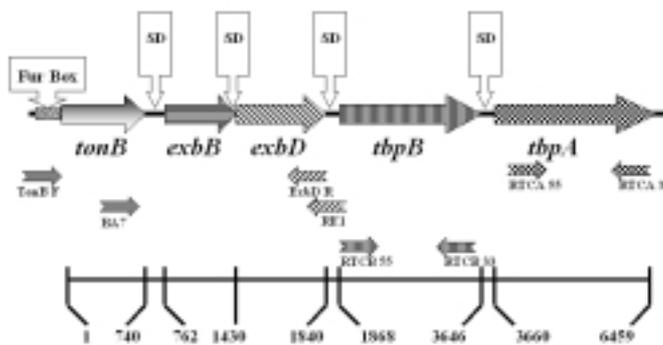


Figura 5. Disposición de la región *tonB-exbB-exbD-tbpB-tbpA* en *H. parasuis*, con el tamaño de cada uno de los genes. Fur Box, caja Fur, SD, secuencia de Shine-Dalgarno.

riormente a los genes *tbpB* y *tbpA* ni tampoco parece que estén organizados de ese modo en *H. influenzae* ni en *Mannheimia haemolytica*, ya que la secuencia anterior al gen *tbpB* no presenta ningún grado de homología con la secuencia correspondiente a los genes *exbBD* de *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*. La aparición en *H. parasuis* de los cinco genes en la misma región, con un posible promotor localizado, únicamente, antes del inicio de transcripción del gen *tonB* y no entre los genes *tonB-exbB*, *exbB-exbD*, *exbD-tbpB* y *tbpB-tbpA*, coincide también con lo descrito en *A. pleuropneumoniae* y en *A. suis*. En relación con este hecho, la localización de una única secuencia consenso de promotores antes del codón de iniciación del gen *tonB*, unida a la ausencia de cualquier otra a lo largo de las 7 kb de longitud de la región *tonB*, aún después de comprobar las secuencias consenso de promotores descritas para *A. pleuropneumoniae*, podría indicar que en este microorganismo estos genes se encuentran regulados posiblemente bajo el control de un único promotor. Este posible promotor, localizado antes del inicio de transcripción del gen *tonB* en *H. parasuis*, presenta una gran homología tanto en la región consenso -10 como en la -35, con respecto a las secuencias consenso de promotores descritas para *A. pleuropneumoniae*.

Al inicio de la secuencia de la región *tonB* de *H. parasuis* se localizó una única caja Fur (*ferric uptake repressor*), situada antes del codón de iniciación del gen *tonB*. Por tanto, podría postularse que la regulación de los genes que se encuentran en la región *tonB* de *H. parasuis*, precedidos por una caja Fur al comienzo de la misma, estaría controlada por la proteína Fur. Finalmente, las secuencias de iniciación de la traducción (Shine Dalgarno) que preceden a los cinco genes que forman parte de la región *tonB* de *H. parasuis* y la ausencia de promotores específicos de cada gen son

indicios de que los cinco genes forman parte de un operón, como sucede en *A. pleuropneumoniae* (6).

No se han descrito hasta la fecha las proteínas que transportan el hierro desde la membrana externa a las proteínas citoplasmáticas encargadas de la liberación del mismo al citoplasma.

Hasta la fecha, el hierro es el único componente con influencia demostrada en la expresión de las proteínas que forman parte del receptor de transferrina. De este modo la captación de hierro mediada por proteínas de unión a transferrina en *H. parasuis* está regulada positivamente en función de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo. Así, las proteínas ExbB, TbpA y TbpB aumentan su nivel de expresión en medios carentes de hierro, mientras que cuando la concentración de hierro es suficiente en el medio de cultivo existe una expresión basal de las mismas. La proteína Fur inhibe la transcripción de los genes que están implicados en el proceso de captación de hierro en condiciones de hierro suficientes en el medio de cultivo, y desempeña la función contraria, cuando el hierro está ausente.

La obtención de mutantes delecionados en un gen particular o en aquellos en los que se ha suprimido su función por inactivación, nos ayuda a conocer su función en la bacteria y por extensión, su participación en la patogénesis de las enfermedades. Con dicho propósito se están ensayando la utilización de mutantes en los genes descritos anteriormente que intervienen en la captación de hierro mediante proteínas de unión a transferrina y a sideróforos en *H. parasuis*. En *A. pleuropneumoniae* se han obtenido y caracterizado mutantes deficientes en los genes *tbp* (1), demostrándose que las proteínas TbpA y TbpB son factores de virulencia en esta especie bacteriana. También en *A. pleuropneumoniae* se ha conseguido obtener mutantes de uno de los genes que intervienen en el aporte energético necesario para la internalización del hierro, el gen *exbB*. La pér-

didada de virulencia en el mutante *exbB*⁻, se debe a la imposibilidad por parte de la bacteria de utilizar transferrina porcina (6).

En cualquier caso debe señalarse, que la descripción en *H. parasuis* de sistemas de captación de hierro a partir de proteínas receptoras Tbp y sideróforos, no excluye la existencia de otras alternativas, como viene enseñando el estudio de modelos de Gram-negativos próximos, pues la trascendencia de este elemento en la biología de las bacterias obliga a éstas a desarrollar varias posibilidades. En *A. pleuropneumoniae*, por ejemplo, que dispone de toxinas Apx, se ha demostrado la capacidad para obtener hierro de la hemoglobina liberada por la acción hemolítica de las toxinas.

Bibliografía

1. Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF (2002) Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. FEMS Microbiol Lett 209:283-7
2. Charland N, D'Silva CG, Dumont RA, Niven DF (1995) Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. Can J Microbiol 41:70-4
3. Faraldo-Gomez JD, Sansom MS (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. Nat Rev Mol Cell Biol 4:105-16
4. del Río González, ML (2004) Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
5. del Río González, ML (2004) Proteínas de unión a transferrina y a sideróforos como sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. V Reunión del Grupo de Microbiología Molecular, Jaca
6. Tonpitak W, Thiede S, Oswald W, Baltés N, Gerlach GF (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. Infect Immun 68:1164-70

Ejercicios de equivalencia ente métodos de análisis de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas de consumo

Ferrán Ribas

Aiguës de Barcelona - Comisión de Normalización y Validación de la SEM

E-mail: fribas@agbar.es

Una de las principales actividades a impulsar desde la Comisión de Validación y Normalización (CNV) de la SEM es la aprobación en España de métodos alternativos a los de referencia de análisis microbiológicos de aguas y alimentos.

En el campo de la microbiología de aguas, se tomó la decisión de iniciar los estudios dirigidos a este fin con los métodos de análisis de bacterias coliformes y *E. coli* en aguas de consumo.

Tanto la Directiva del Consejo de la Unión Europea 98/83/CE (3 noviembre 1998) como su transposición a la legislación española (Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero) aceptan cualquier método de análisis para los parámetros físico-químicos, con tal que cumpla con unos requisitos de exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación. No obstante, para los parámetros de tipo microbiológico que deben analizarse de acuerdo con la normativa, se fijan unos métodos oficiales concretos de análisis, en general correspondientes a normas ISO. En el caso de las bacterias coliformes y *E. coli*, se trata de la norma UNE EN ISO 9308-1:2000 (abreviadamente, en lo sucesivo, ISO 9308). No obstante, está prevista la posibilidad de utilizar métodos alternativos, siempre y cuando los estados miembros faciliten toda la información de interés sobre dichos métodos y su equivalencia.

Desde el 15 de mayo de 2004 se dispone ya de un procedimiento estándar internacional (ISO 17994) para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos. Sin embargo, esta norma ya se venía utilizando desde hace cierto tiempo en su fase de borrador, lo que ha permitido que en diversos países europeos (Reino Unido, Holanda, Alemania, Finlandia e Italia) se hayan efectuado ya algunos estudios de este tipo.

El camino a seguir, una vez finalizado el estudio, en caso de que éste demuestre que el método alternativo produce resultados equivalentes o superiores a los del método oficial de referencia, es remitirlo a las autoridades sanitarias del país para que acepten las conclusiones del mismo y lo hagan llegar a la Unión Europea, con el fin de que sea aprobado como método cooficial en el país, tras la consulta al *European Microbiological Advisory Group* (EMAG), grupo de expertos en microbiología donde están representados los distintos países de la UE.

Aunque el Estado Español, de acuerdo con el RD 140/2003, acepta que los laboratorios utilicen cualquier método de análisis microbiológico con tal que haya sido validado, acreditado o haya demostrado su equivalencia en el propio laboratorio (equivalencia *in house*), desde la CNV de la SEM creemos interesante que los métodos más comúnmente utilizados en nuestro país o los que implican nuevos criterios y se están abriendo camino de modo creciente, sean sometidos a un ensayo de equivalencia en el cual participen distintos laboratorios (un mínimo de 5-6) y se analice un mínimo de unas 260 muestras, para que estos métodos alternativos puedan ser considerados, a nivel general (no de un laboratorio en particular) como cooficiales en España.

Métodos seleccionados

Tras discusiones previas con los laboratorios interesados, se han seleccionado tres métodos alternativos para su comparación con la norma ISO 9308:

1) El Colilert 18, que es un medio de cultivo líquido basado en un substato cromógeno y otro fluorógeno para determinar respectivamente la actividad de los enzimas β -galactosidasa (presente en los coliformes) y β -glucuronidasa (presente en *E. coli*). La actividad del primer enzima se manifiesta por la aparición de color amarillo en el medio de cultivo y la del segundo por la aparición de fluorescencia. Aunque se trata de un método basado en el número más probable (NMP), el alto número de réplicas analizadas (51 pocillos en un formato de bandeja denominado Quantitray) permite obtener resultados comparables con métodos basados en unidades formadoras de colonias (UFC) (**coordinación del ejercicio:** Ferran Ribas, Aguas de Barcelona).

2) Los agares cromogénicos, basados en los mismas actividades enzimáticas del Colilert, pero ligadas a dos substratos cromógenos. El medio de cultivo utilizado en los ensayos llevados a cabo es el agar Chromocult (**coordinación del ejercicio:** Eva Tusell, Mina Pública de Aguas de Terrassa).

3) La combinación de los medios de cultivo m-Endo para coliformes totales y m-FC para *E. coli* (**coordinación del ejercicio:** Corrie Allaert, Universidad de Lleida).

La coordinación general de los 3 ejercicios corre a cargo de Ferran Ribas, de la CNV de la SEM.

Mientras que los dos primeros métodos corresponden a nuevos criterios de definición de lo que es un coliforme (carácter β -galactosidasa positivo) y una *E. coli* (carácter β -glucuronidasa positivo), el tercero es un protocolo de trabajo que se viene utilizando desde hace muchos años en un buen número de laboratorios españoles y se basa, al igual que el método descrito en la norma ISO 9308, en la fermentación de la lactosa con producción de ácido, en el carácter oxidasa negativo (confirmación de coliformes totales) y, adicionalmente, en la obtención de indol del triptófano a 44 °C (confirmación de *E. coli*).

Análisis estadístico

De acuerdo con los principios del procedimiento ISO 17994, la comparación de dos métodos se basa en la diferencia relativa media de los recuentos confirmados. La diferencia relativa (x) se define como:

$$x_i = \ln(a_i) - \ln(b_i), \text{ donde}$$

a_i = recuento confirmado por el método alternativo en la muestra i , y

b_i = recuento confirmado por el método de referencia en la muestra i .

En el caso de que uno de los recuentos confirmados sea cero, la fórmula para la diferencia relativa se aplica bajo la forma

$$x_i = \ln(a_i + 1) - \ln(b_i + 1)$$

El motivo de este procedimiento es evitar la necesidad de omitir las muestras en que hay un cero. No obstante, si ambos resultados dan cero, la muestra no se considera para el estudio de equivalencia.

La evaluación de la equivalencia se basa en la diferencia relativa media (x) y en la incertidumbre expandida (U), calculada a partir de la desviación estándar de la media:

$$U = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Para que se considere que el método alternativo es equivalente o superior al método de referencia las únicas condiciones imprescindibles son que $x + U$ tenga valor positivo y que $x - U$ tenga un valor superior a $-0,10$. En caso de que se cumpla la segunda condición pero no la primera, se consideran ambos métodos prácticamente equivalentes, pero se trata de una situación excepcional que correspondería a incertidumbres expandidas anormalmente bajas.

También se utilizan técnicas estadísticas para evaluar la normalidad de los datos (Walk-Shapiro)

y las diferencias entre laboratorios (análisis de la varianza).

Como se ha comentado, se utilizan los datos analíticos confirmados. En los medios de cultivo basados en recuentos de células (UFC), se ha confirmado un máximo de 10 colonias presuntivas por muestra: todas las colonias cuando se detectan entre 1 y 10, y 10 colonias al azar cuando hay más de 10. En el caso particular del Colilert, este criterio se ha aplicado a los pocillos presuntivos para coliformes totales (amarillos); los cultivos obtenidos a partir de pocillos presuntivos para *E. coli* (amarillos y fluorescentes a la vez) han sido un subconjunto de los (diez) pocillos amarillos.

Las características bioquímicas utilizadas para la confirmación han sido, en los dos primeros ejercicios, además de las previstas en la norma ISO 9308, que definen el ensayo de equivalencia estándar (oxidasa para los coliformes totales y indol a 44 °C para *E. coli*), ácido de lactosa a 37 °C, ácido de lactosa a 44 °C, β -galactosidasa y β -glucuronidasa. En el tercer ejercicio, dado que todos los métodos ensayados se basan en la fermentación de la lactosa, no se han utilizado las pruebas adicionales de ácido de la lactosa a distintas temperaturas, pero si las relacionadas con los enzimas característicos de los medios cromogénicos y fluorogénicos. Todo ello ha permitido la obtención de una importante información complementaria a la estrictamente necesaria para la realización de un ensayo de equivalencia estándar, que será objeto de futuros estudios.

Realización de los ejercicios.

Estado actual

Bajo los auspicios de la CNV de la SEM, se efectuó entre finales de 2003 (a partir del último Congreso de la SEM) y principios de 2004 el reclutamiento de diversos laboratorios participantes, sobre todo entre los pertenecientes a abastecimientos de agua (a través de la Comisión 2ª de la Asociación Española de Abastecimiento y Saneamiento, AEAS) y entre los inscritos en los ejercicios de intercalibración EQUASE, para lo que se aprovecharon sus reuniones periódicas.

Tras la redacción de un protocolo y una jornada de entrenamiento (*training session*) que se desarrolló en la Universidad de Lleida en febrero de 2004, se iniciaron inmediatamente los ejercicios.

Una de las ventajas más importantes de la operativa de los ensayos de equivalencia es que no es preciso efectuar envíos de material entre laboratorios, sino que, por el contrario, cada laboratorio prepara sus propias muestras. El motivo es que, en este caso, lo más importante es que las mues-

tras que se ensayan paralelamente con los dos (o cuatro, en el caso del tercer ejercicio) métodos sean alícuotas procedentes exactamente del mismo frasco.

El estado actual de los tres ejercicios se describe a continuación.

Equivalencia ISO 9308 (TTC) - Colilert 18 Quantitray 51

Nueve laboratorios han analizado 333 muestras, habiéndose confirmado con los mismos criterios 3.055 cepas procedentes de Colilert y 2.800 cepas procedentes de TTC. De todas esas cepas se dispone de información acerca de las características bioquímicas anteriormente indicadas.

El trabajo experimental del ejercicio ya ha sido finalizado y se presertó un avance provisional de los resultados en la última reunión del Grupo de la SEM de Microbiología del Medio Acuático (septiembre-octubre de 2004).

Los resultados obtenidos son esperanzadores de cara a los objetivos propuestos en el ejercicio y está previsto tener a punto el informe sobre el mismo, actualmente en fase de redacción, para su entrega al Ministerio de Sanidad y Consumo antes de final de año.

Equivalencia ISO 9308 (TTC)/Cromogénicos

Siete laboratorios han analizado hasta el momento 184 muestras, habiéndose confirmado 1.552 cepas procedentes de cromogénicos y 1.602 procedentes de TTC. De todas esas cepas se dispone también, como de las procedentes del ejercicio anterior, de información acerca de todas las características bioquímicas anteriormente indicadas.

De acuerdo con el procedimiento ISO 17994, el número mínimo recomendado de muestras para este tipo de ensayos es de 256, por lo que, en este caso, el número de muestras analizadas es aún insuficiente. No obstante, para coliformes totales, tanto aplicando los criterios de confirmación del TTC como los descritos para cada método, se obtienen diferencias relativas medias positivas del orden de 0,25 - 0,35, lo cual significa que los valores obtenidos por el método alternativo son de un 25 a un 35 % superiores (Cuadro 1 y Figura 1).

En cambio, para *E. coli*, de acuerdo con los criterios de confirmación del TTC, el método de referencia presenta unos valores del orden del 20 % superiores. Por otro lado, si se hace intervenir en el criterio de confirmación la β -glucuronidasa, esta diferencia se reduce a menos de un 8 %, mejorando el rendimiento del cromogénico, pero, por la incertidumbre expandida asociada, el

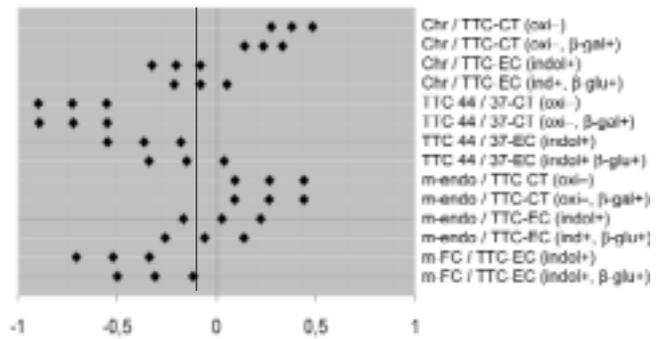


Figura 1. Resumen provisional de parámetros de equivalencia ($x-U$, x , $x+U$). Coliformes totales (CT) y *E. coli* (EC)

número de muestras es aún demasiado bajo para poder sacar conclusiones definitivas. Mientras que el ejercicio podría darse por finalizado para coliformes totales, es preciso analizar más muestras para poder opinar con argumentos sólidos sobre el comportamiento de *E. coli*.

Equivalencia ISO 9308 (TTC) - m-Endo/m-FC.

Cinco laboratorios han analizado hasta el momento 164 muestras, pero aún están pendientes de estudio los perfiles de las cepas aisladas en los distintos laboratorios por los diferentes métodos. En este caso, como ya indicamos, no se incluyen los ensayos de ácido de lactosa a 37 °C y 44 °C, por lo que los perfiles comprenden únicamente cuatro características: oxidasa, indol a 44 °C, β -galactosidasa y β -glucuronidasa. No obstante, han podido efectuarse análisis de equivalencia provisionales de acuerdo con el procedimiento ISO 17999.

En este ejercicio, se han analizado para cada muestra no dos medios de cultivo paralelos (como en los ejercicios anteriores) sino cuatro que, además, implican jugar con dos temperaturas de incubación distintas: TTC a 37 °C, TTC a 44 °C, m-Endo a 37 °C y m-FC a 44 °C.

Es interesante constatar que, en este estudio, aunque no se utilicen medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos, se ha considerado interesante utilizar también los criterios de confirmación propios de este tipo de nuevos medios de cultivo: β -galactosidasa para coliformes totales y β -glucuronidasa para *E. coli*.

Se han efectuado las comparaciones de equivalencia de todas las combinaciones posibles entre los cuatro medios de cultivo, pero sólo nos referiremos a aquellas en que interviene el método de referencia (TTC a 37 °C):

- TTC 44/TTC 37 (Coliformes totales y *E. coli*)
- m-Endo 37/TTC 37 (Coliformes totales y *E. coli*)
- m-FC 44/TTC 37 (*E. coli*)

Cuadro I. Resumen provisional de los parámetros de equivalencia de los ejercicios no finalizados: Cromógenos/TTC y m-endo, m-FC/TTC.

COMPARACIÓN	MICROORGANISMO	CRITERIO	x	U	x - U	x + U	n
Chromocult/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻ (1)	0,3794	0,1036	0,2758	0,4830	184
		oxi ⁻ , β-gal ⁺ (2), lac ⁺ (3)	0,2358	0,0953	0,1405	0,3311	180
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,2041	0,1221	-0,3262	-0,0820	177
		indol ⁺ , β-glu ⁺ (4)	-0,0809	0,1330	-0,2139	0,0521	170
TTC 44/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻	-0,7265	0,1723	-0,8989	-0,5542	162
		oxi ⁻ , β-gal ⁺	-0,7220	0,1710	-0,8930	-0,5509	162
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,3649	0,1843	-0,5492	-0,1807	137
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,1515	0,1890	-0,3404	0,0375	137
m-endo 37/TTC 37	Coliformes totales	oxi ⁻	0,2664	0,1730	0,0934	0,4393	163
		oxi ⁻ , β-gal ⁺	0,2646	0,1743	0,0903	0,4390	163
	<i>E. coli</i>	indol ⁺	0,0267	0,1943	-0,1676	0,2209	142
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,0607	0,1983	-0,2590	0,1375	126
m-FC 44/TTC 37	<i>E. coli</i>	indol ⁺	-0,5220	0,1840	-0,7059	-0,3380	134
		indol ⁺ , β-glu ⁺	-0,3096	0,1907	-0,5003	-0,1189	127

(1) Oxidasa⁻; (2) β-galactosidasa⁺; (3) lactosa⁺; (4) β-glucuronidasa⁺.

También resulta interesante la comparación m-FC 44/TTC 44. No obstante, como al comparar TTC 44 con TTC 37 se obtiene, en todas sus variantes, que las diferencias relativas son siempre negativas (es decir, los resultados son significativamente superiores con el TTC 37), se obviarán las referencias a esta comparación. Aunque la propia norma ISO 9308 permite para analizar *E. coli* utilizar el TTC a 44 °C, tomarse en serio una comparación m-FC 44/TTC 44 sería hacer jugar con una ventaja de partida injustificable al m-FC, que en sus resultados se aproxima más al TTC 44 que al TTC 37.

La comparación m-Endo 37/TTC 37 para coliformes totales está dando, por el momento, una diferencia relativa del orden de 0,26 - 0,27, es decir, se obtienen unos valores muy parecidos independientemente del criterio de confirmación considerado, con una incertidumbre que permite hablar de diferencias significativas a favor del m-Endo.

En cambio, para *E. coli* prácticamente no existen diferencias medias (el m-Endo es un 3 % superior si clasificamos a *E. coli* sólo por el indol y un 6 % inferior si hacemos intervenir también la β-glucuronidasa). Aunque, de momento, la conclusión del estudio de equivalencia es que se requieren más muestras, es probable que, al estudiar un mayor número de ellas, se llegue a la con-

clusión de que ambos métodos son equivalentes para *E. coli*.

El panorama no parece tan esperanzador para el m-FC. La comparación m-FC/TTC 37 detecta una diferencia relativa media de -0,31 ó -0,52, según los criterios de identificación, siendo, por tanto, los resultados del TTC 37 significativamente superiores (de un 31 a un 52 %). En este caso parece difícil que, aunque se estudien muchas más muestras, se logre invertir la tendencia de los resultados, por lo que resulta prácticamente imposible que se pueda llegar a encontrar que el m-FC sea equivalente. En realidad, la propia incubación a 44 °C, si bien es cierto que es mucho más selectiva para coliformes termotolerantes (esto se refleja en las características de las cepas aisladas por los distintos medios de cultivo) y, por tanto, para *E. coli*, en contrapartida también recupera una menor proporción de los microorganismos en favor de los cuales se hace la selección que una incubación más genérica (a 37 °C) en un medio menos selectivo. Este último sólo puede llegar a ser un problema para el aislamiento de *E. coli* en aquellas muestras en que la microbiota acompañante no permita un desarrollo adecuado o un correcto aislamiento de *E. coli*. No obstante, en esos casos, no existe la menor duda de que la mejor elección sería el Colilert.