

1
2 Gen



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLÁN"

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE
Salmonella typhimurium LT-2 CAPACES DE UTILIZAR
SACAROSA COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.

T E S I S

Que para obtener el Título de
Q U I M I C O

p r e s e n t a

GERMAN ROMAN COLMENARES VILADOMAT

Director de Tesis:

M. en C. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA
Dra. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Í N D I C E

RESUMEN.	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	2
EVOLUCION ENZIMATICA.	2
UTILIZACION DE SACAROSA POR ENTEROBACTERIAS.	10
ESTRUCTURA Y ORGANIZACION DEL CROMOSOMA BACTERIANO.	17
SISTEMA DE TRANSPORTE.	24
1) Difusión Simple o Pasiva.	25
2) Difusión Facilitada.	25
3) Transporte Activo.	26
4) Translocación de Grupos.	26
5) Metabolismo Vectorial.	27
OBJETIVOS.	28
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
MATERIALES.	29
1) Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	29
2) Conservación de Cepas Bacterianas.	31
3) Bacteriófagos.	31
4) Conservación de Bacteriófagos.	31
5) Reactivos Químicos y Material Radiactivo.	31
6) Medios de Cultivo, Soluciones Isotónicas y Soluciones Amortiguadoras.	32
MÉTODOS.	36
1) Mutagénesis.	36
2) Aislamiento de Bacterias Sac U ⁺	37
3) Selección de Bacterias Str ^R	38
4) Preparación de Inóculos.	39
5) Cinéticas de Crecimiento Bacteriano.	39

6) Obtención de Extractos Libres de Células para Ensayo de Invertasa.	40
7) Ensayo de Invertasa.	41
8) Determinación de Proteína.	42
9) Título de los Lisados Fácicos y Propagación en las Cepas Sensibles.	43
10) Transducción.	45
11) Conjugación.	46
12) Transporte de U-(¹⁴ C)-sacarosa y Competencia con otros Substratos.	48
CAPÍTULO III, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	51
RESULTADOS.	51
MUTAGENESIS Y SELECCION DE MUTANTES Sac U ⁺	51
CRECIMIENTO EN MEDIOS SOLIDOS.	58
AISLAMIENTO DE COLONIAS RESISTENTES A ESTREPTOMICINA.	59
CINETICAS DE CRECIMIENTO.	64
1) Cinéticas de Crecimiento en Glucosa.	64
2) Cinéticas de Crecimiento en Sacarosa.	64
ENSAYO ENZIMATICO.	68
1) Actividad de Invertasa.	68
LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LA MARCA DE UTILIZACION DE SACAROSA.	70
1) Conjugación.	70
2) Transducción.	75
TRANSPORTE.	77
COMPETENCIA EN EL TRANSPORTE.	82
DISCUSION.	88
CAPÍTULO IV, CONCLUSIONES.	95
BIBLIOGRAFÍA.	98

ABREVIATURAS

<i>arg</i> E	Gen que codifica para la enzima acetilornitina desacetilasa EC (3.5.1.16.)
<i>cys</i> C	Gen que codifica para la enzima adenilsulfato cinasa EC (2.7.1.25.)
CW	Donación del cromosoma a favor de las manecillas del reloj.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
DNS	Acido 3,5 Dinitrosalicílico.
D.O.	Densidad Óptica (absorbencia).
F ⁺	Bacteria con un factor sexual autónomo.
F ⁻	Bacteria carente de factor sexual.
F'	Bacteria con un factor sexual autónomo, que lleva marcadores cromosómicos.
Ø	Bacteriófago, también fago.
Glu	Glucosa.
Hfr	Bacteria con un factor sexual integrado al cromosoma (alta frecuencia de recombinación)
his	Aminoácido histidina.
ilv	Aminoácido isoleucina.
leu	Aminoácido leucina.
<i>leu</i> A	Gen que codifica para la enzima 2-isopropilmalato sintetasa EC(4.1.3.12.)
<i>met</i> A	Gen que codifica para la enzima homoserina acetil transferasa EC(2.3.1.31.)
<i>met</i> G	Gen que codifica para metionil-t RNA sintetasa EC(6.1.1.10.)

NG N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (también -
 nitroso guanidina).

pur Purina.

put C Gen que codifica para la enzima fosforibosil
 aminoimidazol-succinocarboxiamino sintetasa --
 EC (2.1.7.69.)

pyr B Gen que codifica para la enzima Aspartato carba
 mil transferasa EC (2.1.3.2.)

RNA Acido ribonucleico.

Sac U⁺ Utilización de sacarosa.

Sac U⁻ No utilización de sacarosa.

ser Aminoácido serina.

ser A Gen que codifica para la síntesis de la enzima
 fosfoglicerato deshidrogenasa EC (1.1.1.95.)

S Ó R Sensibilidad ó Resistencia

Str Estreptomycin.

thr Aminoácido treonina.

trp Aminoácido triptofano.

RESUMEN

Salmonella typhimurium LT-2 no utiliza sacarosa como única fuente de carbono y energía, debido, tal vez, a la carencia de un sistema de transporte para la sacarosa o a la falta de una enzima hidrolítica apropiada, o ambas.

Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron mutantes que manifiestan la capacidad de utilizarla, y por ello se consideró pertinente caracterizar estas mutantes, tanto bioquímica como genéticamente, para tratar de dilucidar en qué forma estas bacterias son capaces de degradar este sustrato y presentar así una capacidad fermentativa atípica; por lo cual estas cepas pueden ser motivo de una incorrecta clasificación bacteriológica.

Asimismo, este tipo de estudios nos permiten, al comparar las mutantes con las cepas silvestres progenitoras, comprender los mecanismos de transporte y utilización de sacarosa en enterobacterias.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

EVOLUCION ENZIMATICA.

En los cultivos bacterianos existen características - que los hacen un excelente modelo experimental para sistemas genéticos, tales como el elevado número de microorganismos que componen el cultivo (estudio de poblaciones), - la brevedad del tiempo de generación, la facilidad de su cultivo en medios simples, la sencillez de su cromosoma y, finalmente, la fuerza de las presiones selectivas del medio de cultivo, contribuyendo todos estos factores a su rapidísima evolución (Davis *et al.*, 1978).

A través del empleo de sistemas de cultivo apropiados se pueden modificar estas características permitiéndonos, por tanto, observar los procesos evolutivos de los microorganismos en un corto tiempo.

Dentro de los aspectos más importantes de los proceesos evolutivos de las células bacterianas tenemos los cambios que permiten al microorganismo adquirir nuevas capacidades catabólicas y, como consecuencia, sobrevivir a las modificaciones que el medio ambiente le impone. Estos cambios son permanentes y hereditarios en la célula y se han

denominado mutaciones, con excepción de los que se derivan de la inclusión, segregación, o a la recombinación de materiales genéticos de otras procedencias, y considerando que es el ácido desoxirribonucleico (DNA) el material genético determinante en la célula, en él se presenta el fenómeno de mutación. Watson y Crick (1953) al proponer su modelo de doble cadena para el DNA, infirieron que como consecuencia del mismo se podría explicar el fenómeno de mutación. Estos autores se apoyaron en la posibilidad de que las cuatro bases nitrogenadas del DNA pueden existir en diferentes formas tautoméricas, que se originan por rearrreglo de la distribución de protones y electrones en la molécula, y también existen derivados químicos de ellas. Cuando una base se encuentra en su forma tautomérica rara o de alguno de sus derivados químicos, varían sus propiedades de apareamiento, es decir, que una base puede aparearse con otra, con la cual normalmente no lo hace. Es normal que la timina se aparee con adenina, en cambio en su forma tautomérica rara se une a la guanina; la citosina, que regularmente lo hace con la guanina, en su estado tautomérico raro lo hace con la adenina; la adenina, que se aparee normalmente con la timina, en su estado tautomérico anormal lo hace -- con la citosina, y por último, guanina, que se une a citosina en su estado tautomérico raro se aparee con la timina. Watson y Crick propusieron que estos apareamientos erróneos

podrían dar lugar a mutaciones del DNA durante su replicación. La mejor demostración de la hipótesis de Watson y Crick sería verificar por análisis directo, que un par específico de bases en el DNA ha sido substituido por otro, pero en la práctica se recurre a métodos indirectos para verificarlo.

Existen diversos métodos para producir mutaciones. Entre los más prometedores está el empleo de agentes químicos que, además de ser altamente mutagénicos, se conoce que reaccionan en cierta forma con las bases del DNA o son incorporadas en él mismo, en el sitio de las bases normales.

Uno de los agentes químicos más ampliamente usados como mutágenos por los genetistas bacterianos, y que hasta hace poco fue el mutágeno químico más potente, es la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (de ahora en adelante simplemente NG) (Lee *et al.*, 1977). Este compuesto induce por lo menos una mutación por célula tratada en condiciones que permiten obtener cerca del 50 por ciento de células sobrevivientes (Adelberg *et al.*, 1965). Las células sobrevivientes, dado que han sufrido cambios en las bases nitrogenadas de la estructura de su DNA, pueden cambiar por este efecto la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos mensajeros (mRNA) que son formados a partir del DNA, considerándose células mutantes y, por consiguiente, éstos a su vez pueden cambiar la secuencia de aminoácidos de las proteínas --

que son sintetizadas según la secuencia de nucleótidos de estos mRNAs, produciendo finalmente proteínas diferentes a las de la célula no mutada (White *et al.*, 1968). En el caso específico de que la proteína alterada sea una enzima, se puede observar dicha mutación mediante la expresión, por ejemplo, de una nueva capacidad biológica que le permite a la célula sobrevivir a los cambios que el medio ambiente le impone.

Desde antes de la década de los cuarentas, se hablaba de la expresión de tales capacidades biológicas como un "entrenamiento" o "adaptación" de los microorganismos a nuevas condiciones de crecimiento, que eran adversas para esa especie dada y que se manifestaba por un cambio en su metabolismo, como por ejemplo, el crecimiento en ausencia de un aminoácido antes requerido, la fermentación de un carbohidrato que antes no se utilizaba o la resistencia a drogas (Hegeman y Rosenberg, 1970; Clarke, 1974). Sin embargo, dicho cambio metabólico es el resultado de la mutación del genoma bacteriano, en sus genes estructurales y/o reguladores, ya sea por pérdida del material genético, por inserción de genes de otro organismo o previamente modificados *in vitro*, por duplicación de genes preexistentes y modificación de -- una de las copias, o por otros mecanismos (Riley y Anilionis, 1978).

Asimismo, la capacidad biológica de la célula bacteriana también ha evolucionado como una consecuencia de las mutaciones y de la posterior selección de las mutantes en el ambiente apropiado, dando como resultado la pérdida de capacidades biológicas, tal vez, por dejar de ser necesaria expresión funcional. La información genética desaparece o -- puede quedar críptica (Hegeman y Rosenberg, 1970). Son las propiedades del material genético, reflejadas en las mutaciones y la capacidad seleccionadora del medio ambiente, -- los factores que permiten la adaptación evolutiva.

Con el conocimiento de la estructura y funcionamiento del genoma bacteriano, se inicia el estudio de las "mutaciones de ganancia", que no son otra cosa que los cambios genéticos necesarios, que aunados a un buen sistema de selección, permite la aparición o expresión de nuevas actividades enzimáticas, cuya información no se tenía, o en el caso de que se tuviera, permanecía silenciosa.

La evolución enzimática se ha estudiado principalmente como la respuesta de utilización de nuevos substratos no degradados normalmente por las cepas silvestres. Rosenberg, en su revisión sobre evolución enzimática (Hegemann y Rosenberg, 1970) clasifica las mutaciones de ganancia en cuatro tipos:

- a) Cambio de la especificidad de inducción de la o las

enzimas.- Esto se debe básicamente al cambio en la particularidad de una enzima de ser ahora inducida por el nuevo sustrato.

b) Cambio de la regulación de un sistema enzimático.- Esto se logra volviéndose constitutivo un sistema anteriormente inducible, con actividad mínima o normal hacia el nuevo sustrato.

c) Adquisición de permeabilidad para un sustrato antes impermeable.- Se obtiene a través de la modificación de la difusión del sustrato a través de la membrana celular, pudiendo ahora el nuevo sustrato penetrar el interior de la célula.

d) Resistencia a productos metabólicos tóxicos derivados de la degradación del nuevo sustrato.

Los primeros estudios sobre la utilización de nuevos sustratos por microorganismos fueron hechos por Lederberg en 1951, quien seleccionó mutantes de *Escherichia coli* capaces de crecer en neolactosa, un compuesto no utilizado como fuente de carbono por la cepa nativa, supuestamente porque la β -galactosidasa no ataca a este carbohidrato. El resultado de sus investigaciones fue que las mutantes producían la enzima constitutivamente, por lo que la deficiencia en la cepa silvestre para crecer en neolactosa se debe a que ésta no induce la formación de la maquinaria enzimática pa-

su degradación. Esto es un ejemplo de mutación de ganancia clasificado como cambio de la regulación de un sistema enzimático.

Lester y Bonner (1956) estudiaron en *E. coli* la utilización de rafinosa en mutantes obtenidas por inducción con luz ultravioleta, el crecimiento en este sustrato lo lograron después de dos pasos mutagénicos: el primero, que lleva a la síntesis constitutiva del operón *lac* y, el segundo, inducible a la síntesis de una α -galactosidasa.

El grupo de Lin, trabajando con *Aerobacter aerogenes*, que es capaz de utilizar L-arabitol y ribitol, más no xilitol como fuentes de carbono, obtuvo mediante varios procesos mutagénicos, mutantes capaces de utilizar xilitol como única fuente de carbono (Wu, Lin y Tanaka, 1968). Por análisis posterior, estos autores descubrieron que los procesos mutagénicos realizados lograron que la permeasa que antes sólo reconocía al L-arabitol ahora permitió la entrada de xilitol. Igualmente la deshidrogenasa que era específica para ribitol ahora también reconoce al xilitol. Este es otro ejemplo de mutaciones de ganancia en el que observamos cambio en la especificidad de la proteína de transporte y en la enzima hidrolítica.

Dentro de los estudios realizados en México en el campo de la evolución adquisitiva, sobresalen los trabajos realizados por el grupo del Dr. Ortega, quienes trabajando con

Salmonella typhimurium LT-2, que no es capaz de utilizar -- aspartato ni L-glutamato como única fuente de carbono indujeron mutaciones de ganancia en dicha cepa, empleando NG ob--
teniendo mutantes capaces de crecer en medio mínimo con -- L-glutamato como única fuente de carbono. En estos estudios bioquímicos y genéticos acerca de la utilización y el trans--
porte de L-glutamato en esta cepa, reportan que se requiere de una mutación en el gene regulador o en el sitio operador para expresar un sistema de transporte tanto para el L-glu--
tamato y el L-aspartato. También reportan que la utiliza--
ción de glutamato está dada por una aspartasa y que ésta se encuentra codificada por el gen *asp A* y que al lesionarse --
dicho gen se pierde el fenotipo $Glt U^+$ (Alvarez de la Cua--
dra, 1979).

Más recientemente, en 1981, el mismo grupo del Dr. Ortega, trabajando sobre la utilización lenta de β -glicerofos--
fato por mutantes de *S. typhimurium* LT-2 obtenidas mediante tratamiento mutagénico con NG, muestran resultados en los --
que se demuestran que estas mutantes transportan el β -glice--
rofosfato y posteriormente es hidrolizado a glicerol, sien--
do luego utilizado mediante la vía de este último compuesto (De la Garza, 1981).

UTILIZACION DE SACAROSA POR ENTEROBACTERIAS.

Los caracteres bioquímicos utilizados en la taxonomía de las *Enterobacteriaceae* son habitualmente una determinante cromosómica. Se atribuye, en general, que como consecuencia de un proceso mutagénico o a una recombinación cromosómica, ésta nos pueda conducir a que un caracter taxonómico sea atípico en una cepa bacteriana. En esta eventualidad, la característica atípica es generalmente estable y no transferible.

En la taxonomía bacteriana es importante distinguir - los caracteres determinados por el cromosoma propio de la bacteria, de los casos en que el cromosoma posee unida una información adicional que hace que la célula cambie alguno de sus caracteres bioquímicos o alguna de sus características antigénicas, dado que los sistemas de diagnóstico dicotómico son peligrosos, ya que un solo caracter atípico -- eventual orientará rápidamente para una clasificación errónea. En tales sistemas, el caracter Sac U⁺ ciertamente -- eliminaría el diagnóstico de *Salmonella*.

La presencia del caracter Sac U⁺ en una cepa de *Salmonella*, es doblemente peligroso para el diagnóstico si se - ha empleado el medio de cultivo en agar triple-azúcar-hierro, en este medio, no solamente el frente y el fondo serán acidificados, ya que en el centro el cultivo parecerá "H₂S ne-

gativo" por razón de la fuerte acidificación (Le Minor *et al.*, 1973). Es muy probable que debido a tal resultado, - el potencial diagnóstico de *Salmonella* será eliminado por la gran mayoría de los laboratorios de diagnóstico bacteriológico.

Es concebible que ciertos caracteres sirvan para definir los biotipos (caracteres designados habitualmente como "d" o "D" en el Manual de Bergey's, en general se encuentran en una determinante plasmídica): La amplitud de acidificar los medios conteniendo sacarosa se presentan habitualmente en *Klebsiella*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Serratia*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* y *Levinea*. Por el contrario, la ineptitud de fermentar la sacarosa nos da la definición de *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella* y *Proteus morgani*.

En la familia *Enterobacteriaceae*, sólo la tribu *Klebsiellae* está caracterizada por un fenotipo estable para la fermentación de sacarosa (Sac U⁺). Para otras tribus, - incluyendo a la íntimamente relacionada *Vibrionaceae*, es - típico observar un inestable fenotipo para la fermentación de sacarosa. Los genes que codifican las características metabólicas variables de un grupo bacteriano similar como son, por ejemplo, la fermentación de lactosa, rafinosa, o sacarosa, se encuentran marcadas como dudosas en el Manual

de Bergey's con "d" o "D" (Buchanan y Gibbons, 1974). Dichos genes normalmente parecen estar localizados en plásmidos, hasta ahora de origen desconocido (Le Minor *et al.*, 1973; Cornelis *et al.*, 1978; Smith y Parsell, 1975). De esta manera, cepas de *E. coli* K-12 o de *S. typhimurium* LT-2, libres de plásmidos, son incompetentes para captar y fermentar sacarosa, o a mutar hacia un fenotipo Sac U⁺ (Veron y Le Minor, 1975; Lengeler *et al.*, 1982). En el grupo de cepas epidemiológicamente relacionadas a estas bacterias, este fenotipo es común e invariablemente unido a la presencia de plásmidos (Le Minor *et al.*, 1973; Smith y Parsell, 1975; Wohlhieter *et al.*, 1975; Cornellis *et al.*, 1978; Alaeddinoglu *et al.*, 1979; Schmid *et al.*, 1982; Lengeler *et al.*, 1982).

Desde finales de la década de los sesentas se han publicado una serie de trabajos que nos permiten esclarecer los mecanismos por medios de los cuales *E. coli* puede fermentar sacarosa. Un plásmido conjugativo fue purificado a partir de una cepa de *S. typhimurium* que fermenta sacarosa y que fue aislada de muestras clínicas por el grupo de Wohlhieter (1975). Este plásmido fue nombrado pUR400 conforme a las reglas de nomenclatura genética (Novick *et al.*, 1976). Dicho plásmido fue transferido mediante conjugación a una cepa protótofa de *E. coli* K-12, el cual le con-

firió simultáneamente los fenotipos de la utilización de - sacarosa y la resistencia a tetraciclina (Schmid *et al.*, - 1982). Experimentos realizados por Schmid y sus colabora- dores, indican que el plásmido codifica por lo menos para la inducción de dos funciones que se involucran en el meta bolismo de sacarosa; la primera es un sistema de transpor- te específico para sacarosa y, la segunda se refiere a una enzima hidrolítica, β -D-fructofuranósido fructohidrolasa - (EC 3.2.1.26), referida como una sacarosa-6-fosfato hidro- lasa (Schmid *et al.*, 1982), la cual fue previamente estu- diada por Chassy y St. Martin en *Streptococcus mutants* --- (Chassy y Porter, 1979; St. Martin *et al.*, 1979).

Estas dos funciones no son detectables en células de *E. coli* K-12 libres de plásmidos. Las células que contie- nen estos plásmidos expresan bajos niveles en el transpor- te de sacarosa y en la hidrolasa de sacarosa-6-fosfato, si son crecidas en glicerol. Si las células son crecidas en substratos inductores como fructosa, sacarosa o rafinosa, las actividades de transporte de sacarosa y la hidrolasa - de sacarosa-6-fosfato, se incrementan arriba de 70 veces, y se clasificaron como substratos no inductores a la glucosa, la galactosa, la lactosa y la melibiosa. Además demos- traron que la inducción tanto del sistema de transporte de sacarosa como de la sacarosa-6-fosfato hidrolasa es simul-

tánea, esto sugiere que ambas funciones se encuentran bajo un control genético común. Esta hipótesis se apoya por -- las propiedades de una mutante constitutiva obtenida por -- el grupo de Schmid a partir de la cepa silvestre, mediante mutagénesis con nitroso guanidina, que presenta niveles al_tos en las actividades de transporte de sacarosa e hidról_isis de sacarosa-6-fosfato, sin haberle realizado inducción alguna.

Por otro lado, la expresión tanto de la hidrolasa de sacarosa-6-fosfato, como del transporte de sacarosa, se ve disminuida en casi 12 veces en su valor normal, si le es -- adicionada glucosa al medio de cultivo. Esta evidencia, -- unida a la observación de que la adición de AMPc al medio de cultivo lleva a su máxima expresión estas actividades, sugiere que el sistema de utilización de sacarosa también puede ser sujeto de represión catabólica, ya que para que un sistema pueda ser sujeto de represión catabólica requie_rre de AMPc y de una proteína receptora del AMPc (CRP), pa-- ra llevar la actividad a su máxima expresión (Perlman *et al.*, 1968) y una deficiencia en cualquiera de estos com-- puestos nos lleva a un fenotipo negativo (Sac U⁻).

Más evidencias acerca del metabolismo de sacarosa fue_ron obtenidas a partir de los estudios realizados con una mutante deficiente en el sistema de la hidrolasa de sacaro-- sa-6-fosfato, pero que sí posee sistema de transporte de --

sacarosa. Dichos estudios muestran que el sistema de --- transporte de sacarosa es inducible por fructosa, pero no por rafinosa o sacarosa, sugiriendo que la fructosa o un derivado de ella como la fructosa-fosfato es el inductor de los genes de sacarosa (*scs*), por lo tanto, la sacarosa y la rafinosa necesitan ser hidrolizadas mediante la sacarosa-6-fosfato hidrolasa, para convertirse en inductores (Schmid *et al.*, 1982). También se determinó que el sistema de transporte de sacarosa es dependiente del sistema de fosfotransferasas (PTS), codificado en el cromosoma de la bacteria (Hays, 1970; Kunding *et al.*, 1964), estos autores han determinado que el transporte mediado por el sistema de PTS involucra una fosforilación vectorial, ya que la introducción de sacarosa al interior de la célula nos lleva a una acumulación de sacarosa-6-fosfato. Los estudios de la fosforilación de sacarosa *in vitro* realizados por Lengele nos reportan que esta fosforilación es típicamente dependiente del ácido fosfoenol pirúvico (PEP) y éste no puede ser reemplazado por adenosín trifosfato (ATP) en la mezcla de reacción, constituida por vesículas de membrana que contiene la enzima que es codificada por un gene del plásmido, que capacita a la bacteria al transporte de sacarosa y que Schmid denominó *scs A*; dicha enzima corresponde dentro del sistema de transporte de sacarosa al componente II

y es denominado E II^{scr}, la cual actúa concertadamente con las funciones solubles del sistema de fosfotransferasas -- (PTS), que está constituido por la enzima EI, las proteínas transportadoras (HPr) y la enzima III (E III^{glc, scr}), que están codificadas en el cromosoma de la célula huésped (Lengeler y Lin, 1972; Lengeler *et al.*, 1972).

Posteriores estudios realizados por el grupo de Schmid acerca de la actividad enzimática de la enzima sacarosa-6-fosfato hidrolasa, nos muestran que dicha enzima se encuentra localizada intracelularmente, ya que se detectó esta actividad en extractos crudos de células toluenizadas, pero no se detectó esta actividad enzimática en fracciones de membrana ni en preparaciones por "choque" en frío.

La hidrólisis de sacarosa-6-fosfato es óptima a un pH de 6.6 en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM. La enzima se reporta estable por tres días a 4°C o dos horas a 37°C. Esta enzima cataliza la hidrólisis de β -D-fructósidos, como la sacarosa-6-fosfato, sacarosa y rafinosa; las constantes de Michaelis reportadas para estos tres substratos son: 0.17-0.05; 60-10; y 150-10 mM, respectivamente, estos resultados sugieren que la sacarosa-6-fosfato fue el substrato esencial de la enzima. α -D-glucósidos y galactósidos como melibiosa no son hidrolizados. Estos datos clasifican a la enzima como β -D-fructofuranósido fructohidrolasa (EC 3.2.1.26).

Esta enzima está constituida por dos subunidades idénticas con un Mr de 55,000 cada una; por lo tanto, el dímero de 10,000 corresponde a la enzima activa.

Mediante análisis cromatográficos de substratos radioactivos metabolizados por las bacterias sac U^+ demostraron que la sacarosa transportada al ser hidrolizada produce -- glucosa-6-fosfato y fructosa, por lo que el producto inmediato formado en el proceso de introducción de la sacarosa mediante el sistema de transporte dependiente de PTS fue - sacarosa-6-fosfato fosforilada en el C_6 de la glucosa.

En la figura 1 se muestran las relaciones entre los genes y las enzimas del metabolismo de sacarosa en *E. coli* K-12 propuestas por Schmid y colaboradores (1982).

ESTRUCTURA Y ORGANIZACION DEL CROMOSOMA BACTERIANO.

Análisis genéticos realizados en *E. coli* y *S. typhimurium*, han mostrado que todos los genes están localizados y unidos en una sola molécula circular de DNA de doble cadena de casi 1400 μ de longitud y de 20 a 60 Å de diámetro. Este DNA está asociado a RNA y proteínas básicas, formando el cuerpo cromático de la bacteria. Este cuerpo cromático no está delimitado por una membrana nuclear a diferencia - de las células eucarióticas y se encuentra doblado en for-

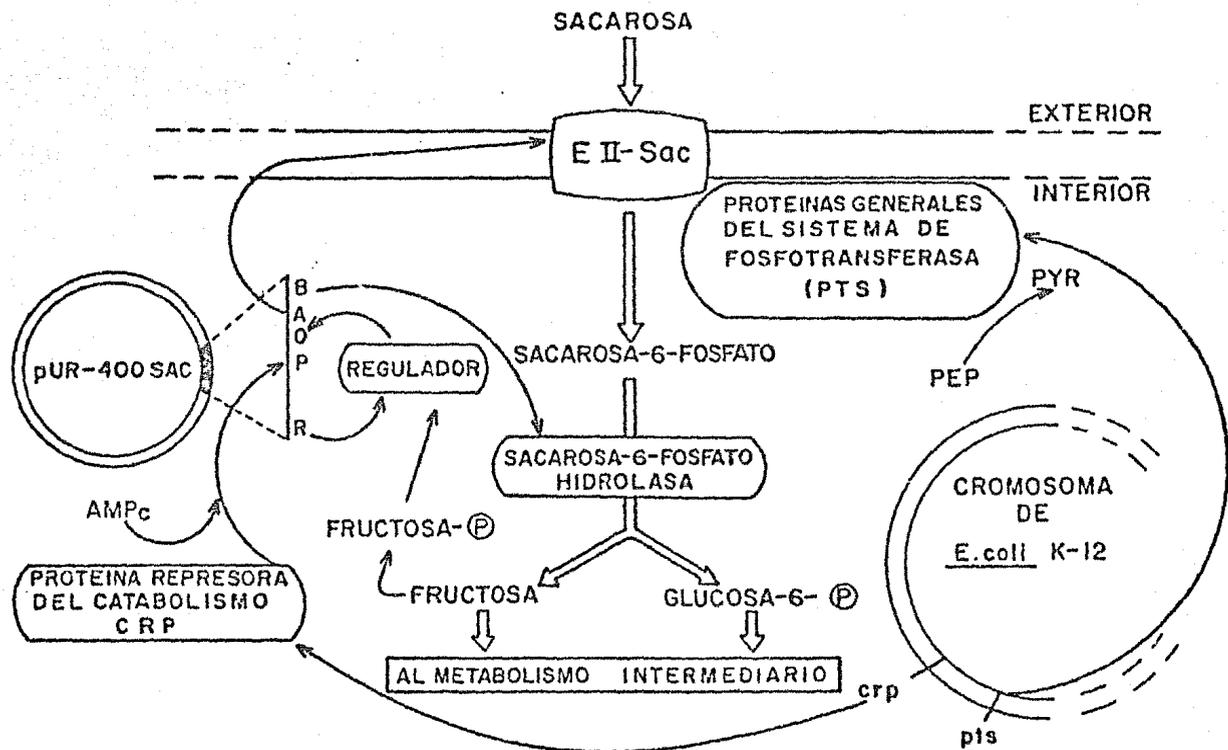


FIGURA 1

RELACIONES GENE-ENZIMA DEL METABOLISMO DE SACAROSA EN *E. coli* SCHMID et al. 1982

ma compleja dando la impresión de ser parte de una compacta madeja de hilo. Esto hace pensar que existe algún modo de organización dentro de la estructura terciaria del DNA probablemente asociado a la presencia de las proteínas básicas que le permite contener las muy variadas formas que los cuerpos cromáticos pueden adoptar, así como el mantenimiento de una continua replicación semiconservativa del DNA y de la formación de mRNA para la síntesis de proteínas.

Sin embargo, no toda la información genética de las bacterias se encuentra confinada en su cromosoma. Existen otros elementos genéticos no cromosómicos, formados también por DNA de doble cadena organizado en moléculas circulares covalentemente cerradas, las cuales se encuentran en el citoplasma de la célula. Estos elementos genéticos se estudian bajo el nombre genérico de plásmidos y son replicados autónomamente y heredados a las células hijas durante la división celular (Lederberg, 1952).

Las funciones esenciales de la célula (obtención de energía, metabolismo, división celular, etc.) están codificadas en los genes cromosómicos, los plásmidos codifican para funciones adicionales a estos genes y dan a la célula proseedora de ellos capacidad de sobrevivir y ventaja de crecimiento bajo condiciones ambientales particulares.

La replicación de los plásmidos se lleva a cabo en -- dos formas diferentes: i) la replicación conjugativa, que ocurre durante la conjugación, en la cual una sola cadena de DNA queda en la célula donadora y la cadena complementaría se transfiere a la receptora y es replicada para for-- mar un duplicado del plásmido en las dos células; y ii) la replicación vegetativa, que ocurre durante el ciclo normal de la célula, asegurando que las células hijas hereden el plásmido durante la división celular. Estos dos procesos - de replicación son muy similares y no dependen de los mecanismos de replicación del cromosoma.

Los plásmidos son de varios tamaños; se encuentran -- dentro de la bacteria como círculos cerrados covalentemen-- te o enrollados con estructura de superhélice, dando una - vuelta por cada 500 pares de bases. De los plásmidos cuyo peso molecular es mayor a 3×10^7 sólo se encuentran de 1 a 3 copias por célula y los plásmidos de peso molecular me-- nor a 3×10^7 se encuentran en más de 10 copias de cada uno de ellos por célula.

Muchas bacterias resistentes a antibióticos poseen la resistencia a ellos en genes de plásmidos llamados plásmi-- dos R y el mecanismo de resistencia es completamente dife-- rente del de una mutante cromosómica resistente al mismo - antibiótico. Estos plásmidos causan considerables proble--

mas médicos y veterinarios, porque muchos de ellos son conjugativos y pueden ser transferidos particularmente entre diferentes géneros de enterobacterias y porque muchos de ellos poseen resistencia específica a más de una droga y en muchos casos hasta 6 ó 7 antibióticos no relacionados entre sí.

Al igual que en los organismos superiores, en las células bacterianas existen células macho y hembra (Lederberg y Tatum, 1946; Makela, 1963; Baron *et al.*, 1968), indicando que la bacteria puede poseer un factor sexual. La diferencia de sexo entre las células masculinas y femeninas está dado por la presencia de un factor genético específico llamado factor F (de fertilidad), cuando está en la célula es macho (F^+); y si le falta, la célula es hembra (F^-). Este factor F es un pequeño cromosoma circular supernumerario de DNA de doble cadena, cerrado mediante enlaces covalentes, es decir, es un pequeño plásmido que se distingue de los demás, dada su particular capacidad de integrarse - al igual que los cromosomas de fagos lisogénicos al cromosoma bacteriano en varias posiciones, comportándose como un juego de genes cromosómicos durante la replicación y la división celular. Esta capacidad de permanecer tanto en forma libre en el citoplasma bacteriano o integrado al cromosoma, le confiere al factor F el nombre de episoma (Jacob

y Wollman, 1958). En general existe uno de estos anillos por cromosoma y su peso molecular es de 6×10^7 , lo que equivale al 2% del peso molecular del cromosoma bacteriano.

Se inicia el ciclo sexual, cuando se unen ambos tipos de células por medio de un "puente estrecho" denominado -- puente de conjugación, por el que comienza a migrar el cromosoma del macho hacia la célula hembra. Este proceso se llama conjugación.

La transferencia generalmente es incompleta, penetrando a la célula receptora sólo parte del cromosoma del macho, antes de realizarse la separación, formándose células parcialmente diploides. Luego hay entrecruzamiento entre el cromosoma del macho y el de la hembra, seguido de un -- proceso de segregación que da origen a una progenie de células haploides (recombinación).

El factor F es también capaz de transferirse a sí mismo; así, si se cultivan juntas células F^- con células F^+ en iguales proporciones, el 70% de las células que originalmente eran F^- es convertido a F^+ (Davis *et al.*, 1978).

Cuando una cepa F^+ integra su factor F al cromosoma, se observa que la frecuencia de recombinación aumenta unas 1000 veces con respecto a la cepa F^+ original. Estas cepas se han denominado Hfr que significa "high frequency of recombination", o alta frecuencia de recombinación. En es--

tas cepas la integración del factor F al cromosoma es reversible, revirtiendo a células tipo F^+ (Zinder, 1960).

En las células Hfr, el factor F deja de poder ser transmitido a otras células, lo cual implica que las recombinantes Hfr X F^- son F^- , de forma tal que lo que se transfiere es el cromosoma en el cual el factor F se encuentra integrado.

Tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium* existen cepas que se parecen tanto a la F^+ como a las Hfr ya que en ellas se produjo una escisión anormal del factor F durante la reversión de las formas Hfr a F^+ y el factor F acarrea por error genes del cromosoma bacteriano, denominándose bacterias F' .

Estas células intervienen en procesos de conjugación, pero con una frecuencia inferior a la que presentan las células F^+ . Se transfiere la totalidad del factor F (convirtiendo a la receptora en F^+) junto con un segmento fijo del cromosoma del huésped, que es de menor tamaño que el segmento que transfieren las cepas Hfr. Esta transferencia ha recibido el nombre de sexducción o F-ducción, ya que se parece a la transducción de un fragmento del cromosoma del huésped por medio de un bacteriófago (Hayes, 1968; Davis et al., 1978).

La transducción es un proceso de transferencia de ge-

nes entre las bacterias mediado por partículas virales denominadas bacteriófagos (Sanderson y Demerec, 1965; Howe y Dawson, 1969; Nishioka y Eistenstark, 1970). Los bacteriófagos son partículas virales, cuyo material genético se replica en bacterias. Algunas cepas de bacteriófagos producen una transducción generalizada en la cual puede ser transferido cualquier gen bacteriano, mientras que otras cepas de fagos median transducciones especializadas en las cuales los bacteriófagos tienen cierta preferencia por transmitir únicamente ciertos genes bacterianos (Sanderson, 1972; Enomoto, 1971).

SISTEMAS DE TRANSPORTE.

Una de las funciones de la membrana citoplasmática en las bacterias es el mantenimiento de un flujo continuo de nutrientes y metabolitos entre el citoplasma y el medio -- que la rodea, a una velocidad que corresponda a la actividad fisiológica de la célula, de esta manera una gran cantidad de solutos, metabolizables o no, son transportados -- aun en contra de un gradiente de concentración (Rosen, -- 1978; Stein, 1969; Oxender, 1972).

En los últimos 28 años se ha discutido la existencia de sistemas de transporte especializados diferentes a las

enzimas metabólicas y de muchos de ellos se ha dado evidencia de su existencia mediante ensayos bioquímicos y genéticos. Sin embargo, resulta intrigante el mecanismo molecular por el cual el transporte es llevado a cabo y cómo se integra éste a la maquinaria celular; para ello se han propuesto algunas hipótesis y modelos, que aunque divergentes, tienden a explicar tan compleja función de la célula.

Sus definiciones están dadas de acuerdo a consideraciones cinéticas y termodinámicas, conociéndose las siguientes:

1) *Difusión Simple o Pasiva.*

Es cuando una sustancia atraviesa la membrana como un resultado del movimiento molecular al azar, sin interacción de ningún componente de la misma, el proceso no requiere de energía metabólica y es llevado a favor de un -- gradiente de concentración o electroquímico, no es específico y la velocidad con la que el soluto se transporta dependerá del espesor de la membrana y del coeficiente de difusión entre otros factores (Harold, 1974; Roseman, 1969).

2) *Difusión Facilitada.*

Si el soluto transportado interacciona con un componente de la membrana denominado "acarreador", formando -

un complejo con él trasladándolo hacia el otro lado de la membrana, se denomina difusión facilitada. El proceso puede ser estereoespecífico, implicando con ello que hay diversos sistemas para solutos diferentes y manifiesta una cinética de saturación con el substrato; al igual que para la difusión simple, el soluto se mueve a favor del gradiente de concentración o electroquímico y no requiere de energía metabólica (salvo la necesaria para mantener la estructura de la membrana), pero es más rápido que la difusión (Harold, 1974; Roseman, 1969).

3) Transporte Activo.

Se define el transporte como transporte activo si el soluto es acumulado contra un gradiente electroquímico u osmótico, requiriendo para ello de la energía metabólica y de un sistema "acarreador" en la membrana. Implica la formación de un complejo soluto-acarreador en el lado externo de la membrana, que cruza ésta y posteriormente un cambio de afinidad por el soluto le permite liberarlo en el interior de la célula, quedando libre el acarreador para regresarse e iniciar un nuevo ciclo.

4) Translocación de Grupos.

Este es otro mecanismo de transporte que depende de la energía metabólica de la célula, siendo la penetra--

ción del soluto concomitante a una reacción química que modifica al soluto. Cuando la translocación y la acumulación del sustrato suceden con la fosforilación del mismo, se ha denominado "fosforilación vectorial".

5] *Metabolismo Vectorial.*

Este término fue propuesto por Mitchell (1961) para designar los procesos metabólicos orientados de tal manera a través de una membrana biológica, que el sustrato entra en un lado y el producto es liberado por el otro. Tales reacciones generan un gradiente de concentración que maneja el transporte. Además, si las especies translocadas llevan una carga eléctrica, el metabolismo vectorial generará un potencial de membrana.

Dentro de las translocaciones se conocen dos tipos:

a) *Translocaciones Primarias.*- Son las que estarían asociadas en forma inmediata a las reacciones metabólicas (Harold, 1972). Aquí estarían incluidas la translocación de grupos, que ya se definió, la cual ocurre a nivel del sustrato, y la translocación de solutos unida a una enzima, donde el sustrato *per se* no participa en la reacción, pero es translocado como un resultado de ésta.

b) *Translocaciones Secundarias.*- De acuerdo con Harold (1972), son muchos de los casos del transporte activo.

Se denominan así porque están asociadas a la maquinaria metabólica mediante gradientes de iones y no directamente. - Harold emplea la palabra portador en este tipo de translocaciones.

OBJETIVOS

1. Obtener mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2, capaces de utilizar sacarosa como única fuente de carbono y - energía.
2. Caracterizar cinéticamente estas mutantes.
3. Caracterizar genéticamente estas mutantes.
4. Indagar si las mutantes han desarrollado alguna actividad enzimática nueva para la utilización de sacarosa.
5. Caracterizar cinéticamente el sistema de transporte de sacarosa.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES.

1) Cepas de *Salmonella typhimurium*.

LT-2 (F⁻, Sac U⁻); protófofa, obtenida de la colección del finado Dr. Demerec.

LT-2 Str^R (F⁻, Sac U⁻, Str^R); seleccionada a partir de LT-2 en un medio con 1000 µg/ml de estreptomina.

His D-9 (F⁻, Sac U⁻, Str^S); auxótrofa para histidina, obtenida de la colección del Dr. M.V. Ortega.

His D-9 Str^R (F⁻, Sac U⁻, Str^R); seleccionada a partir de His D-9 en medio con 1000 µg/ml de estreptomina.

SMC-01* (F⁻, Sac U⁺ lenta); derivada de LT-2 por mutagénesis con NG.

SMC-11* (F⁻, Sac U⁺ rápida); derivada de SMC-01 por mutagénesis con NG.

SA-534 (Hfr, Sac U⁻, ser A); donada por el Dr. K.E. Sanderson (Hfr K4); tiempo de entrada en el minuto 137, CW, (O-pyr-B-thr-trp... met A).

- SA-535 (Hfr, Sac U⁻, Ser A); donada por el Dr. K.E. Sanderson (Hfr K5); tiempo de entrada en el minuto 66, CW, (O-met G-pur C----his).
- SR-315 (F', Sac U⁻, leu A); donada por el Dr. K.E. Sanderson (F' SU-9), sitio de integración en el minuto 50, CW, (O-pyr F-trip----pur).
- SA-486 (Hfr, Sac U⁻, ser A 13); donada por el Dr. K.E. Sanderson (Hfr K3), tiempo de entrada en el minuto 93, CW, (O-arg E-ileu-leu----cys C).
- K5-28* (Hfr, Sac U⁺); derivada de SA-535 por mutagénesis con NG.
- K5-29* (Hfr, Sac U⁺); derivada de SA-535 por mutagénesis con NG.
- K4-11* (Hfr, Sac U⁺); derivada de SA-534 por mutagénesis con NG.
- K4-24* (Hfr, Sac U⁺); derivada de SA-534 por mutagénesis con NG.
- F'-10* (F', Sac U⁺); derivada de SR-315 mediante mutagénesis con Ng.

* nombre no registrado.

2) *Conservación de Cepas Bacterianas.*

Todas las cepas Sac U⁺ se conservaron en medio mínimo de Davis N-agar, empleando sacarosa como fuente de -- carbono, en tubos de tapón de rosca con el medio inclinado. Las cepas con marca de auxotrofia se conservaron en igual forma pero en medio enriquecido y guardadas en el refrigerador a 4°C.

3) *Bacteriófagos.*

P-22 Cepa silvestre donada por el Dr. N. Yamamoto.

ES-18 Cepa silvestre donada por el Dr. B.A.D. Stocker.

4) *Conservación de Bacteriófagos.*

Los bacteriófagos se conservaron en medio enriquecido entre 0 y 5°C, con algunas gotas de cloroformo en el medio para evitar la contaminación con bacterias.

5) *Reactivos Químicos y Material Radiactivo.*

L-aminoácidos (serina y leucina), clorafenicol -- (Cmp), Trisma base (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA).

Los fosfatos mono- y dipotásicos, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol etílico, maltosa, tartrato de sodio y potasio, todos - ellos de grado analítico de Baker (Xalostoc, México).

El sulfato de magnesio, sulfato de amonio, sacarosa, cloruro de sodio, acetato de sodio, de Merck (Darmstadt, - Rep. Fed. de Alemania).

Nitroso guanidina de K&K Laboratories Inc. (Plainview, New York, U.S.A.)

Estreptomycin (Str) de Farmacéuticos Lakeside, S.A. (México), NZ case de Sheffiel Chemical (U.S.A.)

Refinosa, dextrosa (glucosa) de Difco Laboratories -- (Detroit, Michigan, U.S.A.)

Acido 3,5-Dinitro salicílico, proporcionado por el -- Ing. Vicente López, del Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Aquasol y U-(¹⁴C)-sacarosa de 50 µCi/0.5 ml de New En gland Nuclear (Boston, Mass. U.S.A.).

6) *Medios de Cultivo, Soluciones Isotónicas y Soluciones Amortiguadoras.*

Agar bacteriológico, extracto de levaduras, peptona de caseína, caldo nutritivo, agar para Salmonella y Shi gella, agar de bilis verde brillante, citrato de Simmons, de Bioxón de México.

Cuando se requirió de medios sólidos se adicionó agar bacteriológico al 1.5% (P/V) antes de ser esterilizados.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 15 lbs/pulg² de presión de vapor (121°C), durante 15 minutos. Las

soluciones de sacarosa, maltosa, rafinosa, leucina, serina y estreptomycinina se esterilizaron por filtración empleando filtros Millipore estériles y se prepararon en el momento de usarse.

Las fuentes de carbono se prepararon al 4% (P/V) y se adicionaron al medio de cultivo estéril para obtener una concentración final de 0.4% (P/V).

Los aminoácidos se emplearon en concentraciones de -- 20 µg/ml. Todos los medios de cultivo llevan solución -- amortiguadora de fosfatos, con sales minerales en concentración de 0.0622 M y pH de 7.0 (Davis y Mingioli, 1950) sin citrato que se denomina Davis normal (Davis N).

Davis N KH_2PO_4 , 3.0 g; K_2HPO_4 7.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g; y agua destilada hasta completar 1000 ml. El sulfato de magnesio se disuelve aparte del resto de las sales.

Medio Mínimo: Davis N, con la fuente de carbono que especifique al 0.4% (P/V).

Medio rico (NCX): Davis N, y 0.2% (P/V) de los siguientes productos: peptona de caseína, extracto de levaduras y NZ case.

Medio para el aislamiento de bacterias Sac U⁺:

Davis N, sacarosa y agar.

Medio para la selección de bacterias resistentes a estreptomycin:

Davis N, glucosa, agar y estreptomycin en concentraciones desde 200 a 1500 $\mu\text{g/ml}$.

Medio para cinéticas de crecimiento:

Davis N, y la fuente de carbono que se especifique.

Medios para inóculos:

Davis N y casaminoácidos al 0.4% (P/V) o el medio mínimo de Davis con la fuente de carbono que se especifique.

Medio para conjugación:

Davis N, extracto de levaduras, peptona, y NZ case, cada una al 0.2% (P/V) con y sin agar.

Medio para la propagación de bacteriófagos:

Davis N, sacarosa y agar, y el mismo para conjugación con agar.

Medio para el título de lisados fágicos:

El mismo medio que es empleado para -- conjugación, pero con agar.

Agar nutritivo blando:

Igual que el medio para conjugación -- pero con agar al 0.75% (P/V).

Agar blando: Davis N y agar al 0.75% (P/V). Se distribuye en muestras de 2 ml y se le -- mantiene a 45°C hasta el momento de -- usarse.

Medio para seleccionar conjugantes:

Davis N, sacarosa y agar adicionada de estreptomina (300 µg/ml).

Medio para seleccionar transductantes:

Davis N, sacarosa y agar.

Solución salina fisiológica estéril:

NaCl al 0.85% (P/V) se distribuye en porciones de 200 ml y se esteriliza en autoclave.

Solución para suspensión de células y ensayo de transporte:

Davis N y cloranfenicol (50 µg/ml).

Regulador de fosfatos para sonicación:

Davis N ajustado a pH de 7.4

Regulador de acetatos:

0.05 M y pH 5.25; 4.10 g de acetato de sodio aforado a 1000 ml con agua destilada y ajustado a pH 5.25

Acido 3,5-dinitro salicílico: también 3,5 DNS:

1 g de ácido 3,5-dinitro salicílico, disuelto en 20 ml de NaOH 2 N, mas 30 g de tartrato de sodio y potasio.

MÉTODOS.

1) *Mutagénesis.*

a) Mutagénesis en Medio Sólido.- La metodología seguida fue similar para todas las mutantes obtenidas en este estudio, y consistió en llevar hasta fase exponencial a un cultivo de células crecidas en medio de NCX, centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Sorvall de mesa a temperatura ambiente y suspenderlas en solución salina fisiológica hasta una concentración aproximada de 10^9 células/ml. De esta suspensión se espatuló 0.1 ml por caja en medio de Davis N-sacarosa-agar. Una vez que se secó la superficie, se colocaron en el centro de la caja unos cristales del mutágeno NG y se incubó a 37°C.

b) Mutagénesis en Medio Líquido.- A partir de un cultivo refrigerado en fase logarítmica de crecimiento, se inoculan matraces nefelométricos de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de NCX y se incuban aeróbicamente durante toda la noche a 37°C en un agitador orbital New Brunswick a 150 rpm. Por la mañana se inoculan tubos con tapón de rosca conteniendo 5 ml de NCX fresco y se incuban a 37°C en un baño con agitación hasta llevar el cultivo hasta su fase exponencial de crecimiento. En este punto los tubos se dejan de incubar y se les adiciona NG hasta una concentración final de 100 µg/ml en condiciones estériles,

se tapan y se agitan fuertemente durante 12 minutos en un agitador Vortex modelo K-550 G a alta velocidad. Los tubos se centrifugaron a 10000xg durante 15 minutos, se desecha el medio de cultivo y el paquete celular es lavado --- tres veces con solución salina fisiológica estéril, resuspendiendo finalmente las células en 1 ml de solución salina fisiológica. Cada tubo se diluye 1:10 con solución salina y de ésta última se toman 0.1 ml de suspensión de células y se siembran mediante dispersión con espátula de vidrio sobre cajas de petri conteniendo medio mínimo sólido de Davis N-sacarosa. Las cajas de incuban a 37°C hasta la aparición de colonias.

2) *Aislamiento de Bacterias Sac U⁺.*

Las mutantes lentas se obtuvieron por mutación con NG a partir de un cultivo de la cepa LT-2, apareciendo entre los 5 y 7 días de incubación a 37°C. Se tomó cada colonia con un palillo estéril y se sembró por parchado en el medio de Davis N-sacarosa-agar y se incubaron las cajas a la temperatura antes mencionada. Para la obtención de las mutantes de crecimiento rápido se siguió el protocolo de mutación en medio líquido a partir de una cepa lenta, - sólo que en este caso las colonias aparecieron entre las - 48 y 72 horas de incubación. Las colonias se separaron y parcharon en la misma forma descrita.

Las bacterias Hfr y F' de lenta utilización de sacarosa se obtuvieron de la misma manera conforme a los enunciados del protocolo de mutación en medio sólido.

3) *Selección de Bacterias Str^R.*

En vista de que las cepas donadoras utilizadas para conjugación revirtieron a protótofas durante el procedimiento para su obtención, se seleccionó una cepa receptora Str^R para contar las recombinantes en un medio con estreptomicina. En esta forma sólo crecerían aquellas bacterias que han recibido la marca Sac U⁺ y que continúan conservando la de la resistencia al antibiótico.

La selección se hizo de la siguiente manera: se sembraron aproximadamente 10⁸ células de un cultivo exponencial de la cepa LT-2 crecida en NCX en medio Davis N-glucosa-agar estreptomicina (de 150 a 1500 µg/ml), se incubaron por 48 horas a 37°C; con estas condiciones aparecieron un promedio de 25 colonias por caja, escogiéndose la que presentó mayor estabilidad para la marca de resistencia a la concentración más elevada de estreptomicina, la que se conservó en medio rico para emplearla posteriormente como receptora.

De la misma manera se procedió a seleccionar una cepa resistente a la estreptomicina de otra receptora, la His -

D-9, la cual también se empleó para los experimentos de -- conjugación.

4) Preparación de Inóculos.

En todos los casos las células se crecieron durante toda la noche a 37°C, en agitación. Cuando se realizó la cinética de crecimiento, los inóculos se prepararon en medio de NCX. Las células se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall SS-1, por 15 minutos a 6000 rpm, se lavaron y se resuspendieron en solución salina antes de usarse.

5) Cinéticas de Crecimiento Bacteriano.

Las condiciones empleadas para los experimentos -- fueron básicamente las indicadas por Parada y Ortega (1967), excepto que los inóculos se crecieron de acuerdo a la cinética a seguir, según se aprecia en el capítulo de Resultados. Las células lavadas obtenidas de los inóculos se distribuyeron en matraces nefelométricos Bellco de 300 ml, -- equipados con tubo lateral de 19 mm de diámetro, con 50 ml de medio de cultivo. Las bacterias se incubaron aeróbicamente a 37°C en un agitador orbital New Brunswick, a una velocidad aproximada de 150 rpm. El crecimiento se determinó cada hora midiendo la densidad óptica de los cultivos

a 660 nm, empleando para ello un espectrofotómetro Coleman Jr. II.

En general se procuró que la lectura inicial fuera de aproximadamente 0.04 unidades de absorbencia. Como blanco se utilizó una alícuota del correspondiente medio de cultivo estéril.

6) *Obtención de Extractos Libres de Células para Ensayo de Invertasa.*

Se siguió la técnica desarrollada por Carrillo-Castañeda y Ortega (1967), excepto que se usaron sacarosa o glucosa como fuentes de carbono para crecer las células.

Las bacterias se crecieron en agitación, en matraces Erlenmeyer de 200 ml con 500 ml de medio Davis N con la fuente de carbono, durante 18 horas a 37°C y se cosecharon por centrifugación a 4°C en una centrifuga Sorvall RC2-B, se lavaron dos veces con regulador de fosfatos por sonicación y se resuspendieron en 10 ml de tris-HCl 0.2 M de pH 7.4. Las células se rompieron por sonicación utilizando una unidad de ultrasonido (Manufacturing Scientific Equipment) a 0.8 Amp durante 4 a 5 minutos totales en intervalos de 30 segundos separando posteriormente los restos celulares de las células intactas por centrifugación a 10000 x g durante 40 minutos a 4°C. El líquido sobrenadante se dializó en frío contra 4000 ml de agua destilada durante 14 horas. Este se denominó extracto crudo.

7) Ensayo de Invertasa.

Para determinar la posible presencia de una enzima con actividad de invertasa en las mutantes Sac U⁺. Se empleó la técnica reportada por invertasa en levaduras (Hestrin *et al.*, 1955).

La hidrólisis de sacarosa es determinada reductométricamente, en el sistema de ensayo reportado por Fischer, -- Kohtes y Felling (1951), la enzima actúa sobre sacarosa al 2.5% en amortiguador de acetatos 0,01 M de pH 4.77 a una temperatura de 20°C.

La unidad de actividad A está definida como la cantidad de enzima que formando parte de la mezcla de reacción, libera 1.0 mg de hexosa reductora (glucosa más fructosa) - en tres minutos. Se realizaron diluciones de 0.1, 0.3, - 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 ml en un volumen final de 1.5 ml a partir del extracto crudo dializado.

A cada dilución se le adicionó 0.5 ml de amortiguador de acetatos 0.01 M a pH 4.77 se agitan suavemente e incuban a 25°C durante 10 minutos. Posteriormente se adiciona a cada tubo 1.0 ml de substrato (sacarosa al 2.5% p/V), se agitan e incuban a 20°C durante 5 minutos. A continuación se agregan 2.0 ml de 3,5 DNS y se incuban a ebullición durante 5 minutos. Se dejan enfriar los tubos hasta temperatura ambiente y se les adicionan 15 ml de agua para deter-

minarles su absorbencia a 540 nm en el espectrofotómetro. El blanco consiste de un tubo que no contiene enzima y que fue preparado simultáneamente con los demás. A cada dilución se le determinó su concentración de proteína, la cual se correlacionaría con la cantidad de producto, para así obtener la actividad específica conforme los resultados -- obtenidos de una curva patrón preparada con una mezcla de glucosa más fructosa cada una a concentración de 10 mg/ml. Esta curva se prepara con diluciones de dicha mezcla desde 0 hasta 1.0 ml añadiéndoles 2.0 ml de 3,5 DNS y 7 ml de -- agua, los tubos se agitan y se incuban a ebullición durante 5 minutos, se enfrían a temperatura ambiente y se les -- determina su absorbencia a 540 nm.

8) *Determinación de Proteína.*

La concentración de proteína presente en los ex-- tractos crudos, se determinó por el método de Groves y colaboradores (1968).

Consiste en restar el valor de densidad óptica del ex tracto a 237.3 nm, del valor obtenido a 224 nm y llevar es ta diferencia a una curva de calibración de proteína hecha con diluciones de albúmina bovina. El método presenta sen sibilidad de $\mu\text{g/ml}$.

Para todos los casos se diluyó el extracto 1:100 y se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración de proteína (µg/ml)} = \frac{\Delta \text{ D.O.} \times 100 \times \text{dil.}}{0.680}$$

9) *Título de los Lisados Fágicos y Propagación en las Cepas Sensibles.*

a) Título.- A un cultivo de la cepa LT-2, incubado durante toda la noche en NCX se le diluyó 1:50 en medio fresco y se dejó en incubación a 37°C bajo agitación hasta que la suspensión alcanzó una densidad óptica de 0.155 a 660 nm. Se mezcló en igual proporción (V/V) con diluciones seriadas del bacteriófago a titular (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}) y se dejó la mezcla en incubación a 37°C en un baño metabólico con agitación suave durante 10 minutos, permitiendo de esta forma la adsorción de los fagos a la superficie de las bacterias. Se tomaron alícuotas de 0.2 ml de la mezcla y se adicionaron a un tubo de agar blando conteniendo 2 ml de éste. Se realizaron tres muestras para cada dilución. El contenido de cada tubo se vació en una caja de petri conteniendo NCX y se incubaron a 24 horas a 37°C después de lo cual se contaron las placas de lisis para calcular el título.

b) Propagación del Bacteriófago en las Cepas SMC-11.- La propagación de los bacteriófagos en la cepa SMC-11 se realizó en medio sólido, para ello se empleó la técnica reportada por De la Garza (1981).

A partir de un cultivo refrigerado en fase logarítmica de crecimiento de la cepa SMC-11 se inocularon matraces nefelométricos conteniendo medio de NCX y se incubaron toda la noche. Por la mañana se inocularon estas bacterias en matraces con NCX fresco y se incubaron en agitación a 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.155 a 660 nm. Se mezclaron en igual proporción (V/V) la cepa bacteriana y el bacteriófago correspondiente, este último en dilución apropiada para obtener placa confluyente (10^7 ufp/ml) y se esperó 10 minutos incubando en agitación suave a 37°C. Se tomaron muestras de 0.2 ml por tubo de agar blando y se sembraron en cajas de petri conteniendo NCX, las cuales se incubaron durante 24 horas a 37°C. Se recogió con el auxilio de una espátula la superficie que contiene el agar blando, donde se encuentran los bacteriófagos, el agar blando recogido se trasladó a un homogenizador Potter, para homogenizarlo. Después del proceso de homogenización se adicionan unas gotas de cloroformo y se incubó en agitación durante 24 horas. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, conservando la fracción sobrenadante con un poco de cloroformo. Al lisado obtenido se le determina el título fágico y se utiliza para obtener un nuevo lisado que se denomina segundo pase. De esta forma se aumentó la probabilidad de que los fagos llevaran la

marca de la utilización de sacarosa. Posteriormente el segundo lisado se le determinó el título y se utilizó para la transducción.

10) Transducción.

En 1952 Zinder y Lederberg fueron los primeros en demostrar la transducción generalizada mediada por el fago P-22 en *S. typhimurium*. Este bacteriófago es de fácil manejo y relativamente alta frecuencia de transducción (De la Garza, 1981), pero acarrea un fragmento transductante pequeño ya que una partícula viral lleva menos del 1% del cromosoma bacteriano, que equivale a una distancia aproximada de 1 minuto de información genética que se transmite mediante conjugación (Sanderson, 1972).

Los experimentos de transducción se hicieron en igual forma para todos los casos, siguiendo los enunciados de -- protocolo descritos por Carrillo-Castañeda y Ortega (1970), pero se usó una multiplicidad de infección de 10 (De la -- Garza, 1981).

La cepa receptora se creció toda la noche en medio de NCX, en las condiciones acostumbradas, diluyéndola en medio nuevo de NCX y creciéndola hasta una densidad óptica de 0.155.

A su vez la cepa del bacteriófago cosechado en el segundo pase se diluyó dependiendo de su título y se mezcla-

ron en igual proporción (V/V), cuidando de tener la multiplicidad de infección estipulada.

Se incubaron en agitación ligera durante 10 minutos a 37°C y se centrifugaron a temperatura ambiente a 3000 rpm por 20 minutos; la pastilla se resuspendió en solución salina fisiológica y se tomaron muestras de 0.2 ml que se pasaron a tubos de agar blando y se vaciaron a las cajas con el medio selectivo.

11) Conjugación.

La técnica de conjugación para *Salmonella* ha sido establecida por Sanderson y Demerec en 1965 con el empleo de filtros de membrana para favorecer el contacto efectivo entre los pares en conjugación.

Las cepas donadora y receptora se crecieron durante toda la noche en agitación en medio de NCX a 37°C, se diluyeron 1:40 en medio nuevo y se crecieron hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 0.155 a 660 nm lo que corresponde aproximadamente a 4×10^8 células/ml.

En un tubo de ensaye se mezclaron 2×10^8 células de la cepa donadora (Hfr o F' con fenotipo Sac U⁺) y 10^9 de la receptora y se pasaron a un filtro Millipore (HAWP-02500, de 0.45 μ m de diámetro de poro), separando el medio de cultivo haciendo un ligero vacío y se colocó dicho filtro sobre

agar nutritivo blando en una caja de Petri incubándose a - 37°C durante 5 minutos para permitir la formación de los - pares conjugantes. Posteriormente se pasó el filtro Milli pore a un matraz Erlenmeyer de boca ancha conteniendo 20 - ml de medio rico y se incubó con agitación muy suave en un baño de agua Eberbach. De esta manera las células se mantienen unidas y se suspenden en el líquido, continuándose la conjugación.

Para efectos de localización cromosómica se prosiguió el apareamiento por 138 minutos (tiempo que tarda en transferirse el cromosoma completo, Sanderson y Demerec, 1965). Se interrumpió la conjugación de la siguiente forma: se tomaron 0.5 ml del medio de cultivo del matraz de conjugación y se pasaron a un tubo conteniendo 4.5 ml de solución salina fisiológica fría (a 4°C), se agitó fuertemente en un agitador Vortex K-550G durante 1 a 2 minutos para separar los pares en conjugación y se pasaron muestras alícuotas de 0.1 ml, por triplicado, a tubos con agar blando, vaciando a las cajas de Petri conteniendo el medio para seleccionar conjugantes.

Se corrieron testigos de las cepas donadora y receptora por separado tanto en el inicio como al final de la conjugación.

En todos los casos se utilizaron donadoras protótofas

Sac U⁺ por lo que se conjugó con receptoras Str^R, utilizando como medio selectivo para obtener recombinantes el medio Davis N-sacarosa-agar-estreptomycinina. En el análisis cinético se toma como tiempo cero aquél en el que el filtro se colocó en el matraz de conjugación.

12) *Transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa y Competencia con otros Substratos.*

a) Transporte.- Los experimentos de transporte se efectuaron de acuerdo al procedimiento dado por Parada y colaboradores (1973) empleando las fuentes de carbono apropiadas.

Las células de las cepas LT-2 y SMC-11 se crecieron toda la noche en sendos matraces conteniendo NCX y se cosecharon por centrifugación, se lavaron con solución salina fisiológica y se inocularon por partes iguales en matraces nefelométricos con sacarosa y en NCX fresco. Se incubaron durante 6 horas a 37°C en aerobiosis, se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y la pastilla se lavó y resuspendió en solución para suspensión de células ajustando la suspensión a una densidad óptica de 0.4 unidades de absorbencia a 660 nm.

Para el transporte se tomaron 3 ml de la suspensión de células, se pasaron a un vaso de doble pared conectado a un recirculador de agua Haake donde se mantienen a 37°C,

adicionando 100 μ l del compuesto radiactivo para dar una concentración final en la mezcla de incubación de 1 μ mol/ml.

Para obtener las cinéticas y las actividades específicas de transporte, se toman muestras de 0.5 ml a intervalos definidos de tiempo (0, 15, 30, 60 y 120 segundos), -- que se filtraron en filtros Millipore (HAWP 02500 con 0.45 μ m de diámetro de poro), se lavaron las células con la misma solución para la suspensión de células conteniendo antibiótico y se pasaron los filtros a viales conteniendo 8 ml de aquasol.

La radiactividad retenida en los filtros se midió en un contador de centelleo Packard Tricarb Modelo 3003, incluyendo como control un estándar de radiactividad sin células.

b) Competencia.- Se determinó la disminución de la actividad en el transporte de U-(14 C)-sacarosa, causada por la competencia con otros sustratos estructurales semejantes a sacarosa, añadiéndose éstos de manera que la concentración final fuera 100 veces mayor que la del compuesto radiactivo.

Se ensayaron los siguientes sustratos no radiactivos (fríos): sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, celobiosa y maltosa. La competencia se midió agregando el compuesto sin marca radiactiva junto con la sacarosa radiactiva y to

mando las muestras de 0.5 ml a tiempos definidos de 0, 30, 60, y 120 segundos después.

Para los cálculos de la actividad en el transporte se restó el valor del tiempo cero y se calcularon los nanomoles transportados por minuto.

La actividad específica se calculó conociendo la cantidad correspondiente al peso seco bacteriano presente en la mezcla de incubación, por nefelometría: un valor de densidad óptica de 0.4 equivale a 0.16 mg de peso seco bacteriano por ml (De la Garza, 1981). Respecto a la competencia se tomó como 0% el valor de radiactividad incorporada por minuto cuando no se ha adicionado competidor sin marca radiactiva.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS.

MUTAGENESIS Y SELECCION DE MUTANTES Sac U⁺.

La NG es un agente alquilante que actúa en las bases expuestas del DNA en replicación, produciéndole transiciones, deleciones y transversiones. Por tanto, su acción es específica del sitio y momento de la duplicación del genoma bacteriano (Cerdá-Olmedo, Hanawalt y Guerola, 1968; - Bolstein y Jones, 1969).

Teniendo como referencia ciertas marcas cromosómicas y dado que es posible obtener mediante un solo proceso mutagénico con NG mutantes vicinales afectadas en dos o más genes, este mutágeno se ha usado para localizar nuevas lesiones cromosómicas.

Las cepas Sac U⁺ lentas se obtuvieron mediante un solo tratamiento mutagénico con NG en medio sólido con Davis N-agar-sacarosa al 0.4%, según el protocolo para mutación en medio sólido mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos.

En este sistema de selección de mutantes se obtuvo un promedio de 24 colonias por caja a los cuatro días de incubación. En la figura 2 se muestra una caja de petri conte

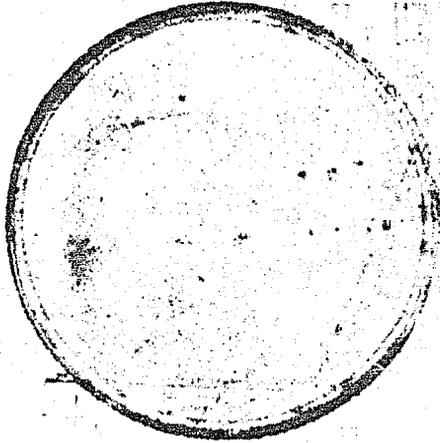


Figura 2. Selección de colonias mutantes de *Salmonella typhimurium* sac U⁺ lentas a las 96 horas de incubación.

Las células de la cepa silvestre se cultivaron hasta la fase logarítmica de su crecimiento en NCX bajo aerobiosis a 37°C, - se cosecharon mediante centrifugación y se lavaron dos veces con solución salina fisiológica. Se resuspendieron en la misma solución y se sembraron por dispersión con espátula de vidrio sobre cajas de petri conteniendo Davis N-agar-sacarosa al 0.4%. Sobre la superficie y al centro de la caja se colocaron unos cristales de NG y se incubaron a 37°C durante varios días.

niendo dichas colonias mutantes. En el centro de la caja se aprecia una zona sin crecimiento microbiano donde se colocaron sobre la superficie del agar los cristales de NG - los cuales difundieron en el medio de cultivo formando un gradiente de forma radial, siendo el centro de la caja por consecuencia la parte de concentración de mutágeno más elevada. Esto produce que la acción mutagénica de la NG en esta zona sea tal que impida el crecimiento bacteriano. Esta zona se ha denominado zona de muerte. Las bacterias -- que estaban en contacto con el mutágeno en menor concentración pudieron crecer, apareciendo colonias pequeñas dispersadas entre sí sobre un área de forma anular con un diámetro de aproximadamente 7 mm. Se observa también que, rodeando a esta zona anular de las colonias Sac U⁺, crecieron unas colonias puntiformes muy pequeñas de distribución aleatoria que mostraron el fenotipo Sac U⁻ y que al parecer no sufrieron acción mutagénica, pero que alcanzaron a reproducirse unas pocas generaciones a expensas tal vez de los nutrientes que mantenían intracelularmente. Este crecimiento sólo se diferenció de las mutantes Sac U⁺ después de varios días de incubación, cuando las colonias crecieron bien definidas a diferencia de las colonias Sac U⁻ que no pudieron crecer más gracias al agotamiento de sus reservas y finalmente murieron.

Como control se emplearon cajas del mismo medio selectivo (Davis N-agar-sacarosa) y se procedió conforme a lo establecido en el respectivo protocolo para mutación en medio sólido, pero sin la adición de NG. En este caso no se observó la aparición de ninguna colonia de *Salmonella*.

Las colonias de probables mutantes de *Salmonella* sac U⁺ se tomaron de sus medios selectivos originales con la ayuda de palillos de madera estériles y se resembraron en Davis N-agar-sacarosa al 0.4% (P/V) y se incubaron a 37°C para separar las colonias y confirmar su capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono.

Las cepas sac U⁺ lentas se obtuvieron con un solo tratamiento mutagénico y, aunque se hicieron varios intentos para obtener mutantes rápidas a partir de la cepa LT-2 en un solo paso, siempre las células obtenidas fueron de crecimiento lento para este sistema particular de mutación y selección. En esta forma se obtuvo la cepa SMC 01. (Fig. 3).

Por otra parte, la cepa sac U⁺ rápida SMC 11 fue obtenida a partir de la cepa SMC 01 mediante un segundo tratamiento mutagénico con NG en medio líquido durante 10 minutos, conforme a los enunciados del protocolo respectivo --mencionado en la sección de Métodos y seleccionado de nuevo para la utilización de sacarosa. En este caso las colonias mutantes fueron distinguibles a las 24 horas de incu-

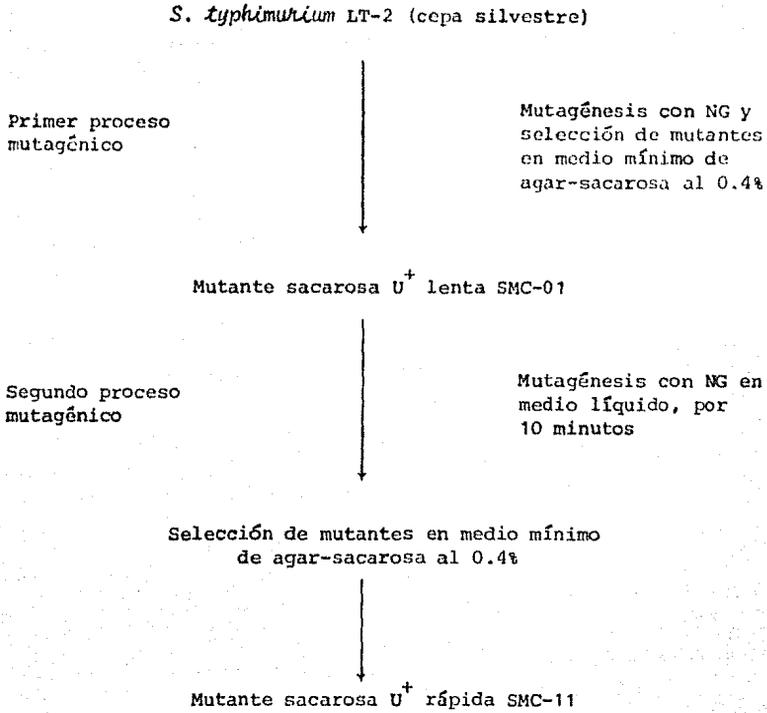


Figura 3. Diagrama de flujo de los procesos mutagénicos y de selección, para la obtención de mutantes sacarosa U⁺ rápidas a partir de la LT-2.

bación y se muestran en la figura 4. En ella apreciamos - que la distribución de las colonias es totalmente aleato-- ría, y que sobre el fondo se aprecian las colonias de cre-- cimiento lento. A las 48 horas de incubación se apreció - una diferencia significativa de tamaño entre las mutantes r-- ápidas y las lentas, y se procedió a resembrarlas en me-- dios sólidos para observar su crecimiento y morfología co-- lonial.

Las cepas F' y Hfr sac U⁺ empleadas en este trabajo - fueron derivadas a partir de sus respectivas cepas F' y - Hfr silvestres que son auxótrofas a serina e histidina, -- respectivamente, y presentan un fenotipo sac U⁻, mediante mutagénesis con NG en medio sólido y seleccionadas también para la utilización de sacarosa sobre Davis N-agar-sacarosa al 0.4%. Después de un tratamiento mutagénico y cuatro -- días de incubación se obtuvo un promedio de 20 clonas que mostraban un fenotipo sac U⁺ de cada una de las cepas tra-- tadas, que mostraron un crecimiento lento en sacarosa. La capacidad de utilizar la sacarosa en las mutantes permane-- ció estable y de esta forma se seleccionaron las mutantes F'-10, K4-11, K5-24, y K5-29.

Sin embargo, se observó que dichas mutantes revirtie-- ron a protótrofas cuando se probaron para ello.

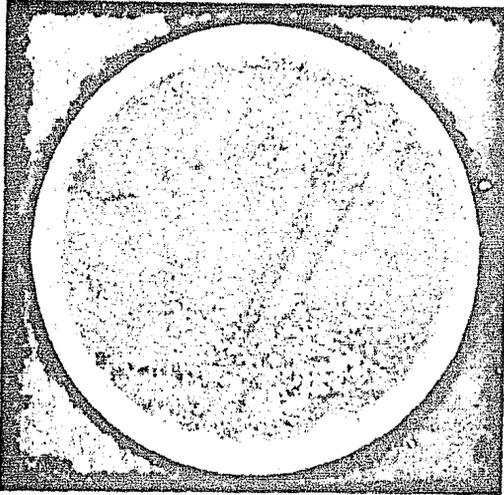


Figura 4. Selección de mutantes de *Salmonella typhimurium* sac U⁺ rápidas a las 24 horas de incubación.

Las células de la cepa Sac U⁺ lenta SMC 01 fueron crecidas toda la noche en NCX bajo aerobiosis a 37°C. Se centrifugaron y se lavaron dos veces con solución salina fisiológica, se resuspendieron en la misma solución y se adicionó NC hasta una concentración final de 100 µg/ml. Se mantuvieron en agitación durante 10 minutos, se lavaron con solución salina, posteriormente se dispersaron sobre cajas de petri conteniendo Davis N-agar-sacarosa al 0.4% y se incubaron a 37°C durante dos días.

CRECIMIENTO EN MEDIOS SOLIDOS.

Cuando las cepas sac U⁺ lentas se cultivaron en cajas empleando sacarosa como única fuente de carbono y energía (a partir de inóculos de la misma fuente de carbono), las colonias fueron visibles hasta las 60 horas de incubación y permanecieron pequeñas (aproximadamente 1 mm de diámetro). El crecimiento de estas cepas en Davis N-agar-glucosa al 0.4% fue rápido y las colonias que se observaron median unos 4 mm de diámetro a las 48 horas de incubación al igual que las de la cepa silvestre progenitora LT-2 empleada como control de crecimiento en este medio de cultivo. En algunas de las colonias mutantes se presentaron diferencias en tamaño, y morfología colonial apareciendo con bordes irregulares. Las cepas mutantes que no mostraron diferencias significativas en su morfología colonial con la cepa progenitora LT-2 fueron inoculadas en medios selectivos propios para *Salmonella* como son citrato de Simmons, agar SS y EMB. Las colonias que se comportaron típicamente como salmonelas.

A diferencia de las cepas lentas, las rápidas requirieron un tiempo de incubación de sólo 24 horas, mostrando colonias con tamaños casi iguales tanto en Davis N-agar-sacarosa, como en Davis N-agar-glucosa a los de la cepa silvestre LT-2 crecida en NCK.

Todas las mutantes Sac U⁺ fueron inoculadas en los medios selectivos mencionados anteriormente para observar su morfología colonial. En las figuras 5 y 6 se muestran algunos ejemplos de estos resultados y en la Tabla I se resumen los resultados de crecimiento en medios sólidos de las diferentes cepas empleadas en este trabajo.

AISLAMIENTO DE COLONIAS RESISTENTES A ESTREPTOMICINA.

Dado que las cepas Hfr y F' mutantes empleadas como donadoras para la conjugación revirtieron a protótofas durante el proceso de mutación, se procedió a aislar una cepa resistente a estreptomicina a la cepa silvestre LT-2, con el objeto de tener una cepa receptora de la marca para la utilización de sacarosa con una marca cromosómica útil para el proceso de conjugación interrumpida.

Se obtuvieron muchas colonias resistentes a concentraciones bajas de estreptomicina (de 50 a 200 µg/ml) y a más de 400 µg/ml no se obtuvo ningún crecimiento microbiano. En la figura 7 se observan las colonias resistentes a 300 y 400 µg/ml de estreptomicina. Sin embargo, estas mutantes espontáneas no son estables, ya que con facilidad se convirtieron en sensibles a la estreptomicina aun para concentraciones menores a las cuales fueron inducidas.

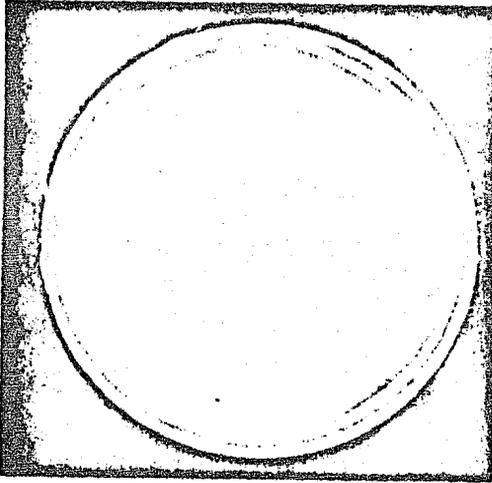


Figura 5. Colonias mutantes de *Salmonella typhimurium* sac U^+ rápidas en Davis N-agar-sacarosa al 0.4%.

Cada una de las colonias fue tomada del medio donde se originaron, auxiliándose de palillos de madera estériles e inoculadas en Davis N-agar-sacarosa al 0.4%, siguiendo la retícula que se muestra en la figura, formando un parche con cada una de las colonias a probar. Los parches fueron incubados a 37°C por varios días para seleccionar las clonas Sac U^+ rápidas.

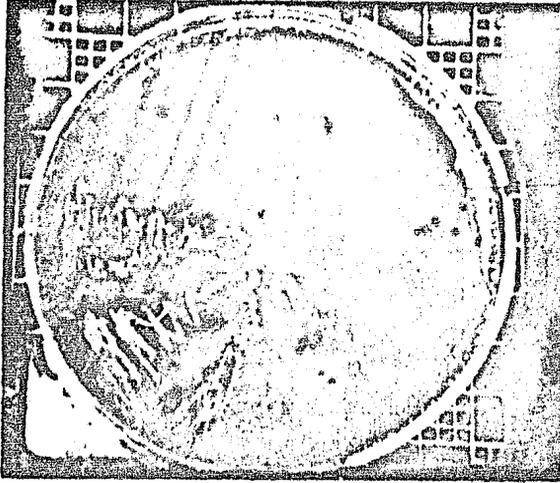


Figura 6. Cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* sac U^+ rápidas --
crecidas en citrato de Simmons.

Los parches de las colonias sac U^+ rápidas se sembraron --
por estría con asa de platino sobre cajas conteniendo citrato de Sim-
mons; la estría recta corresponde a la cepa silvestre LT-2 empleada --
como control. Las cepas que no mostraron crecimiento típico fueron --
descartadas.

TABLA I. Crecimiento en medio sólido de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Fuente de Carbono y Energía					
	Glucosa	Sacarosa	Rafinosa	Citrato	EMB	Estrep.
LT-2	+	-	-	+	+	S
SMC01 (c)	+	-	+	+	s	
SMC11 (c)	+	+	-	+	+	s
F'-10 (b) (c)	+	+	-	+	+	s
K4-11 (b) (c)	+	+	-	+	+	s
K5-24 (b) (c)	+	+	-	+	+	s
K5-28 (b) (c)	+	+	-	+	+	s
K5-29 (b) (c)	+	+	-	+	+	s
Hfr K4 (a)	+	-	-	+	+	s
Hfr K5 (a)	+	-	-	+	+	s
F' (SU-9) (a)	+	-	-	+	+	s
Hfr K3 (a)	+	-	-	+	+	s
His D-9	+	-	-	+	+	R
LT-2 StrR	+	-	-	+	+	R

(a) Por ser auxotróficas requieren Ser y Leu a 20 µg/ml.

(b) Revirtieron a protótofas.

(c) Muestran la utilización de sacarosa en EMB

(+) Crecimiento lento

EMB = Eosina-azul de metileno con sacarosa al 0.4% (P/V)

Citrato = Medio de citrato de Simmons.

Glucosa, sacarosa y rafinosa = 0.4% (P/V)

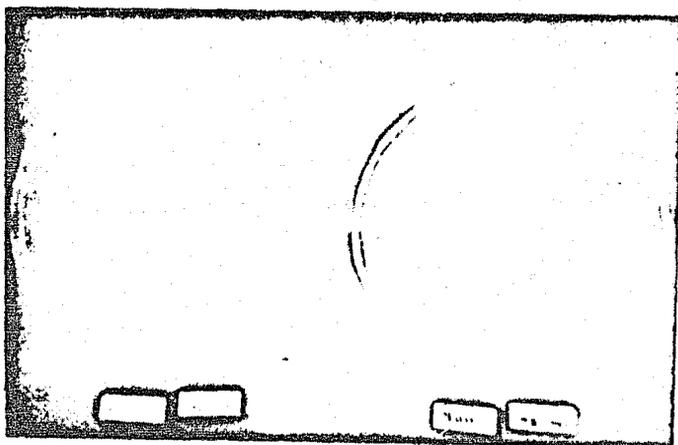


Figura 7. Mutantes espontáneas de *Salmonella typhimurium* LT-2 resis-
tentes a estreptomicina.

La cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* LT-2 fue cre-
cida toda la noche en NCX. Las células se cosecharon mediante cen-
trifugación y se lavaron con solución salina fisiológica, se espatu-
laron sobre cajas con Davis N-agar-glucosa al 0.4%, conteniendo es-
treptomicina en concentraciones de 300 a 1200 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron -
durante varios días. La figura muestra las colonias resistentes a -
300 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, respectivamente.

Por esta razón, se empleó como receptora para los experimentos de conjugación la cepa His D-9. Con esta cepa se obtuvieron colonias resistentes a estreptomicina hasta con una concentración de 1200 $\mu\text{g/ml}$ y mantuvieron esta resistencia. Sin embargo, la cepa resistente perdió la marca de auxotrofia para histidina convirtiéndose en protótofa. Así, se obtuvo la cepa His D-9 Str^R a 1000 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 8 se muestran dos cajas conteniendo mutantes espontáneas resistentes a 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, respectivamente.

CINETICAS DE CRECIMIENTO.

1) *Cinéticas de Crecimiento en Glucosa.*

Estas cinéticas se utilizaron como control positivo del crecimiento microbiano de todas las cepas utilizadas en este estudio ya que el medio líquido de NCX es colorido e interfiere en las lecturas de absorbencia a 660 nm. En la figura 9 se muestran las cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes sacarosa U⁺ lenta y rápida.

2) *Cinéticas de Crecimiento en Sacarosa.*

Las cepas mutantes Sac U⁺ que mostraron un crecimiento apropiado tanto en medio rico de NCX y en los me--

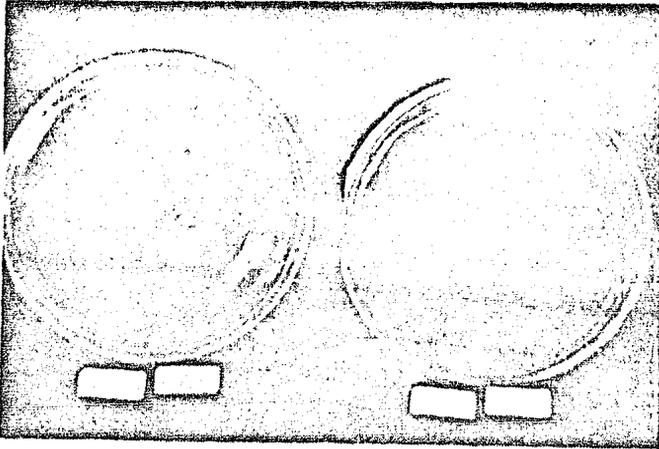


Figura 8. Mutantes espontáneas de la cepa His D-9 resistentes a la estreptomycinina.

Las células de la cepa His D-9 fueron crecidas toda la noche en NCX. Se centrifugaron y se lavaron con solución salina, y muestras alícuotas de ésta fueron espatuladas sobre cajas de petri conteniendo Davis N-agar-glucosa al 0.4%, conteniendo estreptomycinina en concentraciones crecientes desde 50 a 1200 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 37°C durante dos días. Aquí se muestran las colonias resistentes a 300 y 400 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycinina, respectivamente.

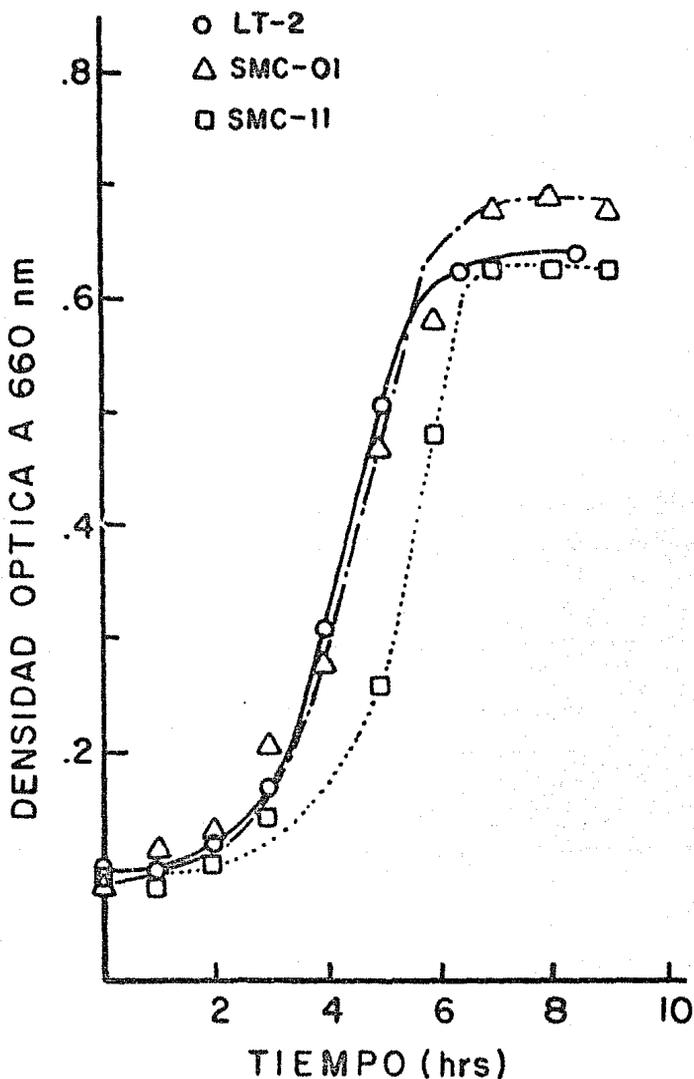


Figura 9. Cinéticas de crecimiento bacteriano de *S. typhimurium* LT-2 y las mutantes sacarosa U⁺ lenta SMC 01 y rápida SMC 11 en medio líquido conteniendo glucosa como fuente de carbono.

Los inóculos se crecieron toda la noche en NCX. Las células se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron con solución salina fisiológica y se pasaron a Davis N conteniendo la fuente de carbono respectiva al 0.4%. (○ —) LT-2; (△ ---) SMC 01; (□ ···) SMC 11.

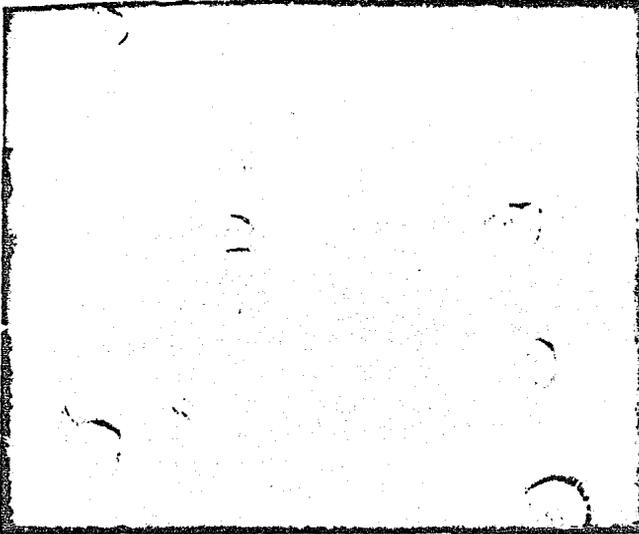


Figura 10. Matraces nefelométricos empleados en las cinéticas de --
crecimiento microbiano, colocados en la charola AG 250 -
de un agitador orbital New Brunswick. Las condiciones de operación
fueron: temperatura 37°C, velocidad de agitación 150 rpm.

dios selectivos, les fueron determinadas sus cinéticas de crecimiento en medio de Davis N-sacarosa al 0.4% en agitación a 37°C, según el protocolo mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos.

En estas cinéticas de crecimiento se tomó la precaución de que las cepas no estuvieran inducidas para la utilización de sacarosa, para ésto, los inóculos fueron crecidos en medio de NCX líquido. En la figura 11 se muestran las cinéticas de crecimiento obtenidas para la cepa LT-2 y las mutantes Sac U⁺ lenta SMC-01 y rápida SMC-11 cuando son crecidas en medio de Davis N-sacarosa al 0.4% como única fuente de carbono.

ENSAYO ENZIMÁTICO.

1) *Actividad de Invertasa.*

Para poder obtener información acerca de una posible actividad enzimática de invertasa, se procedió a preparar los extractos libres de células de las cepas LT-2 y de las cepas mutantes Sac U⁺ lenta y rápida, siguiendo los enunciados del protocolo respectivo referido en el capítulo de Materiales y Métodos.

Los extractos crudos obtenidos fueron mantenidos a --4°C, e inmediatamente probados para determinar la activi--

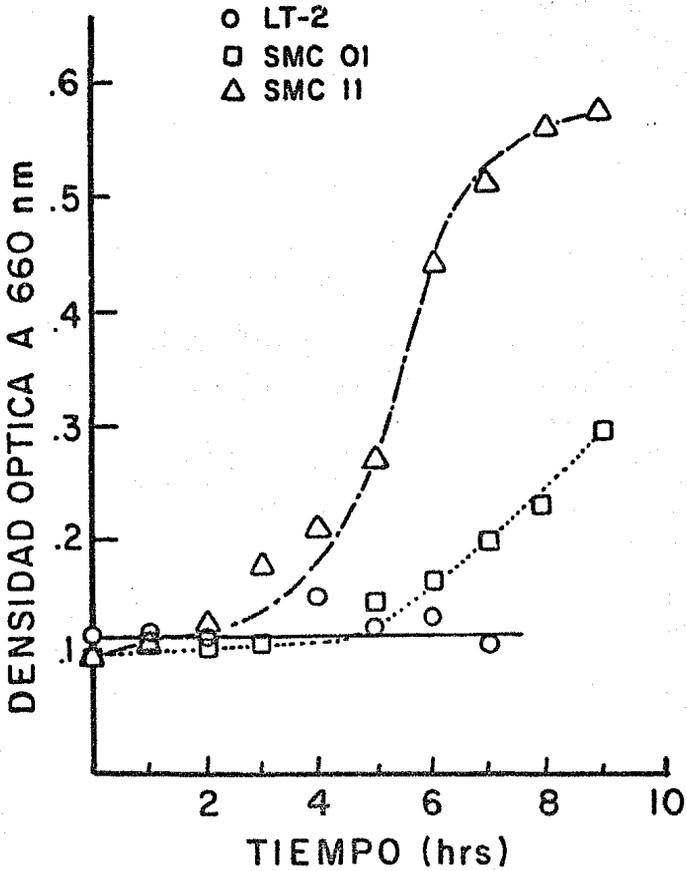


Figura 11. Cinéticas de crecimiento microbiano de *S. typhimurium* - LT-2 y las mutantes Sac U⁺ SMC 01 lenta y SMC 11 rápida en medio líquido, conteniendo sacarosa como fuente de carbono, a) 0.4%.

Los inóculos se prepararon como se describe en la figura 10.

(○ —) LT-2; (□ ·····) SMC 01; (△ - - - -).

dad de invertasa como se menciona en el protocolo respectivo mencionado en el capítulo de Materiales y Métodos.

La curva patrón del ensayo de invertasa se muestra en la figura 12.

A los extractos crudos se les determinó la concentración de proteína mediante fotolorimetría, se diluyeron apropiadamente y se probaron para determinar su actividad de invertasa, y se observó que en ninguna de las cepas se detectó actividad de sacarosa. Los resultados se muestran en la Tabla II.

LOCALIZACION CROMOSOMICA DE LA MARCA DE UTILIZACION DE SACAROSA.

1) *Conjugación.*

Considerando que en *E. coli* K-12, los genes que codifican para la utilización y transporte de la sacarosa están localizados en un plásmido y que no existen reportes en la literatura acerca de una posible presencia de estos marcadores en el cromosoma, tanto en *E. coli* como en *Salmonella*, se procedió a hacer experimentos de conjugación usando varias cepas donadoras.

Como no se tenía idea de la posición del sitio o sitios genéticos responsables de la utilización de sacarosa, fueron seleccionadas las donadoras, de tal forma que éstas

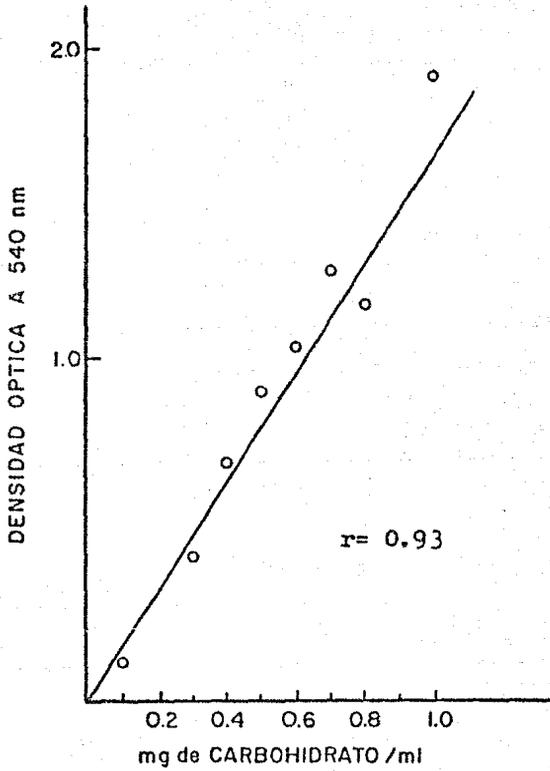


Figura 12. Curva patrón para el ensaye de invertasa.

TABLA II. Actividad de Invertasa*

Cepa	Actividad Específica
LT-2	0
SMC-01	0
SMC-11	0

* La actividad está definida como mg de hexosa reducida (glucosa más fructosa) por mg de proteína en cinco minutos; ésta se determinó en los extractos crudos libres de células de cada una de las cepas mencionadas, preparados según el protocolo respectivo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Las concentraciones de proteína de los extractos oscilaron entre 2 y 200 µg/ml.

iniciaran el proceso de donación en diferentes posiciones del cromosoma de la cepa receptora. Para estos experimentos se emplearon como donadoras las cepas Hfr mutantes Sac U⁺ obtenidas mediante mutagénesis.

No se obtuvieron resultados cuando se probaron las donadoras manteniendo la conjugación durante media hora, que es el tiempo óptimo para ello, por lo que los experimentos de conjugación se hicieron por 138 minutos, siguiendo los enunciados del protocolo respectivo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos.

Los cultivos empleados como controles de los experimentos de conjugación fueron los siguientes: alícuotas de la cepa donadora y receptora tomadas por separado a partir del matraz de incubación correspondiente, fueron adicionadas a tubos conteniendo agar blando y dispersadas sobre los siguientes medios sólidos: NCX, Davis-N-sacarosa, Davis N-glucosa-Str, citrato de Simmons y medio para seleccionar conjugantes; las alícuotas fueron tomadas antes y después de realizada la conjugación, denominándose donadora inicial D_i y receptora inicial R_i a las alícuotas tomadas antes de realizar la mezcla de ambas cepas conjugantes y a las alícuotas tomadas después de transcurrido el período de conjugación son denominadas donadora final D_f y receptora final R_f. Los resultados de estos controles se muestran en la Tabla III.

TABLA III. Controles empleados en los experimentos de conjugación.

	NCX	Citrato de Simmons	Davis N- glucosa-Str	Davis N- sacarosa-Str	Davis N- sacarosa
Receptoras:					
LT-2 Str ^R	R _i +	+	+	-	-
	R _f +	+	+	-	-
His D-9 Str ^R	R _i +	+	+	+	-
	R _f +	+	+	+	-
Donadoras:					
K4-11	D _i +	+	-	-	+
	D _f +	+	-	-	+
K4-24	D _i +	+	-	-	+
	D _f +	+	-	-	+
K5-28	D _i +	+	-	-	+
	D _f +	+	-	-	+
K5-29	D _i +	+	-	-	+
	D _f +	+	-	-	+
F'-10	D _i +	+	-	-	+
	D _f +	+	-	-	+

Se utilizaron para las conjugaciones las donadoras siguientes: Hfr K4-11, Hfr K4-24, Hfr K5-28, Hfr K5-29 y la F'-10; todas estas cepas son lentas para la utilización de sacarosa.

En el primer intento de obtener recombinantes se empleó como receptora la cepa LT-2 Str^R, cuyas características son: F⁻, Sac U⁻, Str^R. Los resultados de estos experimentos de conjugación se muestran en la Tabla IV.

Dado que no se obtuvieron recombinantes con la cepa receptora LT-2 Str^R tal vez debido a su inestabilidad a la resistencia a la estreptomycinina, se procedió a reemplazarla por la cepa His D-9 Str^R que es F⁻, Sac U⁻ y Str^R.

Sin embargo, tampoco se obtuvieron recombinantes con estas cepas. Los resultados se resumen en la Tabla V.

2) Transducción.

Se intentó determinar la posición de la marca para la utilización de sacarosa, mediante transducción generalizada con los fagos P-22 y ES-18.

Para realizar la transducción de la marca Sac U⁺, primeramente se intentó proliferar los bacteriófagos de la cepa P-22 sobre la cepa Sac U⁺ rápida pero dichos intentos fueron infructuosos. Por ello se utilizó el fago ES-18. Este fago presentó mejor capacidad para proliferar en la

TABLA IV

Donadora	Receptora	Número de Recombinantes
Sac U ⁺ , Str ^S	Sac U ⁻ , Str ^R	Sac U ⁺ , Str ^R
K4-11	LT-2 Str ^R	0
K4-24	LT-2 Str ^R	0
K5-28	LT-2 Str ^R	0
K5-29	LT-2 Str ^R	0
F'-10	LT-2 Str ^R	0

TABLA V

Donadora	Receptora	Número de Recombinantes
Sac U ⁺ , Str ^S	Sac U ⁻ , Str ^R	Sac U ⁺ , Str ^R
K4-11	His D-9 Str ^R	0
K4-24	His D-9 Str ^R	0
K5-28	His D-9 Str ^R	0
K5-29	His D-9 Str ^R	0
F'-10	His D-9 Str ^R	0

cepa donadora de la marca de utilización de sacarosa. Sin embargo, los títulos de los bacteriófagos propagados en la cepa SMC-11 en el primer pase fue de 1.4×10^7 ufp/ml y en el segundo pase fue de 2.5×10^7 ufp/ml no pudiendo ser -- aumentado en posteriores experimentos (Fig. 13).

Con estos bacteriófagos se intentó pasar la marca de la utilización de sacarosa a tres cepas del tipo Hfr: la - K3, la K4 y la K5 silvestres, empleando el medio para se-- leccionar transductantes. Sin embargo, no se obtuvieron - transductantes con ninguna de estas tres cepas.

TRANSPORTE.

La cinética de incorporación de U-(^{14}C)-sacarosa fue determinada en células crecidas primeramente en NCX, donde éstas probablemente no sufren la inducción de los sistemas enzimáticos para la utilización de sacarosa y posteriormente fueron tomadas muestras alícuotas de estos cultivos y - se incubaron durante seis horas en medio de NCX fresco y - de Davis N-sacarosa al 0.4%, siendo el cultivo en NCS el - control para demostrar la necesidad de inducción para la - expresión de la utilización de sacarosa.

Es importante mencionar que los experimentos de incorporación de marca radiactiva nos muestran tanto transporte



Figura 13. Propagación del fago ES-18 en la mutante $sac\ U^+$ rápida - SMC 11 (segundo pase).

Para la formación de placa confluyente 5×10^8 bacterias -- por mililitro de la cepa SMC 11 fueron mezcladas con el fago antisalmoneilla ES-18 con un título de 2.5×10^7 ufp/ml (titulado en la cepa silvestre), en una proporción de cinco fagos por cada bacteria. Alícuotas de esta mezcla son adicionadas a tubos de agar blando, y éstos son dispersados sobre la superficie de cajas conteniendo NCX e incubadas hasta la aparición de unidades formadoras de placa de lisis. En la figura observamos las ufp del segundo pase.

como utilización, pero nos permite por una parte comparar la magnitud de esta incorporación con la cepa silvestre; - asimismo, nos permite conocer los substratos para los cuales se presenta competencia en el transporte con respecto al substrato específico del sistema de transporte.

Los resultados del transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa, para los casos en que las cepas fueron preparadas con y sin inducción, se muestran en la figura 14. En esta figura se observa que la cepa silvestre muestra niveles bajos en el transporte de sacarosa radiactiva aun después de haber sido cultivada en presencia de sacarosa (aunque no la esté utilizando), en cambio la cepa mutante Sac U⁺ rápida SMC-11 muestra niveles bajos en el transporte de sacarosa radiactiva cuando no sufrió inducción, pero cuando las células son inducidas en sacarosa notamos un aumento considerable de la incorporación de la sacarosa radiactiva, mostrando una relación lineal para los primeros 120 segundos.

La actividad específica del transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa fue definida como nmoles transportados por minuto por mg de peso seco bacteriano y fue calculada mediante la siguiente relación a partir de las cuentas por minuto (CPM) del compuesto radiactivo determinadas en el contador de -- centelleo.

$$\text{Act. Esp.} = \frac{\text{CPM a 60 segundos} \times \text{factor de conversión}}{\text{CPM del estándar de U-(}^{14}\text{C)-sacarosa}}$$

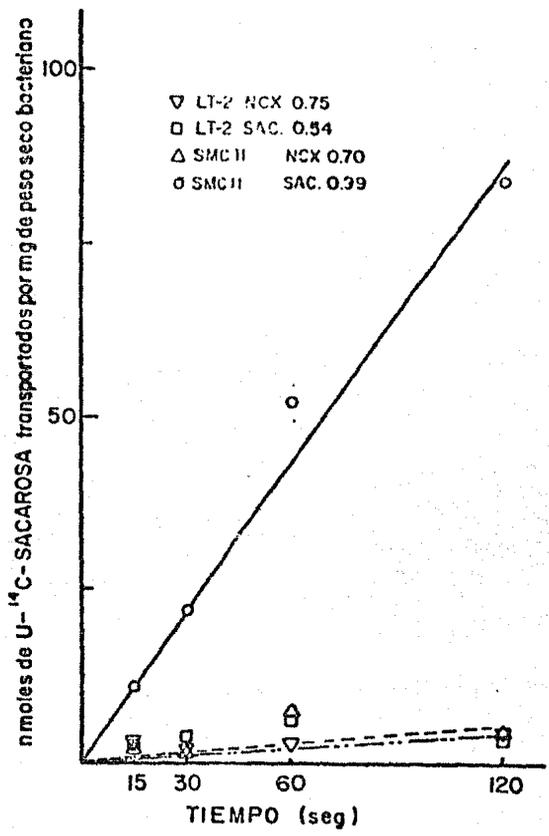
Figura 14. Actividad en el transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa en la mutante SMC 11 y en la cepa LT-2 de *Salmonella typhimurium* con y sin inducción en sacarosa.

Los inóculos se crecieron toda la noche en NCX. Las células se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron con solución salina fisiológica, y se pasaron a los medios de cultivo que se indican en la figura, donde se indujeron por seis horas.

Antes de realizar el protocolo de transporte, las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces en Davis N conteniendo 50 µg/ml de cloranfenicol y se resuspendieron en esta misma solución hasta una densidad óptica de 0.4

	Coef. Corr.
(∇) LT-2 inducida en NCX ∇— —	0.75
(□) LT-2 inducida en sacarosa* □----	0.54
(Δ) SMC 11-01 inducida en NCX Δ....	0.70
(⊙) SMC 11-01 inducida en sacarosa ⊙ ———	0.99

* Las células no crecen en sacarosa, pero se mantuvieron en este medio por seis horas, se cosecharon y se siguió el procedimiento dado en Materiales y Métodos.



donde CPM a 60 segundos, son las cuentas por minuto que -- produce la U-(¹⁴C)-sacarosa, transportadas hacia el inte-- rior de las bacterias en un minuto; CPM del estándar de -- U-(¹⁴C)-sacarosa, son las cuentas por minuto que nos produ-- ce un pulso radiactivo de una solución patrón de 100 µl en una concentración de 1 mM colocadas en el volumen de reac-- ción de 3 ml. El factor de conversión nos relaciona la -- concentración en moles del sustrato radiactivo transporta-- do, con la cantidad de bacterias que lo captaron durante -- un período de tiempo dado y se expresa como nmoles/mg de -- peso seco bacteriano, correspondiendo para nuestros experi-- mentos un valor de 3.75×10^4 nmoles/mg de peso seco bacte-- riano.

La actividad específica para la cepa Sac U⁺ rápida -- SMC-11 inducida en sacarosa mostró un valor promedio de -- 44 nmoles transportados/mg de peso seco bacteriano.

COMPETENCIA EN EL TRANSPORTE.

La competencia en el transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa -- fue determinada en la cepa Sac U⁺ rápida SMC-11.

Se probaron como probables sustratos competidores -- del transporte de sacarosa los carbohidratos que estructu-- ralmente están relacionados con ésta, como son los monosa--

cáridos glucosa y fructosa, el disacárido maltosa y los -- trisacáridos rafinosa y celobiosa; éstos se adicionaron -- sin marca radiactiva (fríos).

El control positivo de competencia en el transporte - utilizado en este experimento fue sacarosa fría. Todos -- los substratos competidores se agregaron 100 veces más con centrados que la sacarosa radiactiva.

Los resultados de los experimentos de competencia en el transporte de la sacarosa radiactiva para la mutante -- Sac U⁺ rápida con los substratos competidores se muestran en la figura 15. En esta figura se observa claramente que el sistema de transporte de sacarosa es altamente específico para sacarosa y que en general no hay competencia con - glucosa, rafinosa, fructosa, maltosa o celobiosa. Cuando - se adiciona sacarosa fría, ésta compite con la sacarosa ra diactiva, observándose este efecto por una drástica disminución en la pendiente de la curva de incorporación de la sacarosa radiactiva, ya que tanto el compuesto radiactivo como el frío son adicionados al mismo tiempo y ambos substratos son transportados, tal vez, por el mismo sistema de transporte.

Se tomó el valor de cero por ciento de competencia en la curva de incorporación de sacarosa radiactiva, donde no hubo adición de substrato frío competidor y con éste se --

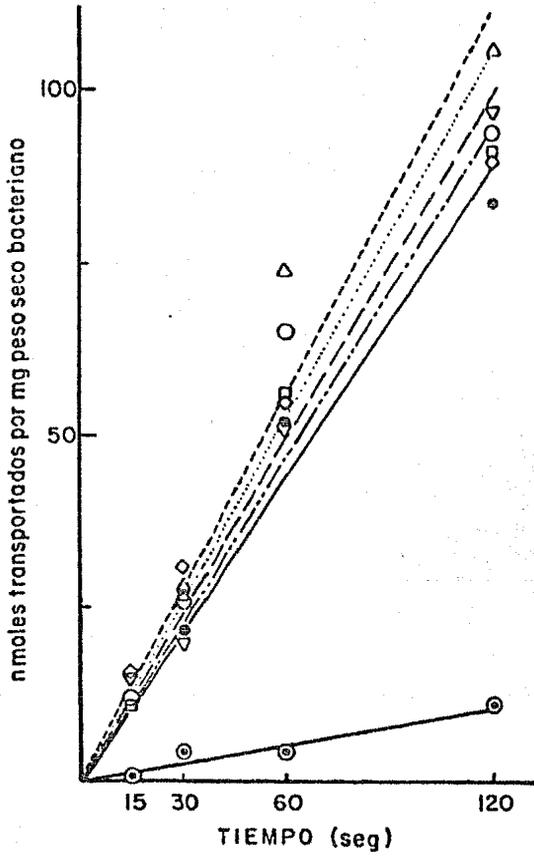
Figura 15. Actividad en el transporte de U-¹⁴C-sacarosa, en la mutante Sac U⁺ SMC-11, y competencia con otros compuestos sin marca radioactiva.

Los inóculos se crecieron toda la noche en NCX. Las células se cosecharon mediante centrifugación, se lavaron con solución salina fisiológica y se pasaron a los medios líquidos que se indican en la figura, y se indujeron por seis horas.

Para el transporte, las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron dos veces en Davis N conteniendo 50 µg/ml de cloranfenicol y se resuspendieron en esta misma solución hasta una densidad óptica de 0.4.

Los compuestos sin marca radioactiva para el experimento de competencia se agregan 100 veces más concentrados que la U-¹⁴C-sacarosa.

	Coef. Corr.
U-(¹⁴ C)-sacarosa (←)	0.99
glucosa (□ - - -)	0.99
rafinosa (○ - - - -)	0.98
maltosa (∇ — —)	0.99
fructosa (Δ - - - -)	0.98
sacarosa (⊙ — — —)	0.97
celobiosa (· · · · ·)	0.97



calculó el porcentaje de competencia para los diversos ---
substratos probados, tomando los valores del gráfico co--
rrespondiente al minuto de iniciado el experimento. Los re
sultados de la actividad específica de competencia en el -
transporte de sacarosa radiactiva se muestran en la Tabla
VI.

TABLA VI. Actividad específica del transporte de U-(¹⁴C)-sacarosa de la cepa Sac U⁺ rápida SMC11 inducida en sacarosa y - la competencia con otros sustratos fríos.

Sustrato Competidor	Actividad* Específica	Porcentaje de Competencia
Ninguno	44	0
Glucosa	47	0
Rafinosa	47	0
Maltosa	50	0
Celobiosa	54	0
Fructosa	58	0
Sacarosa	4	91

* nmoles transportados por minuto por mg de peso seco bacteriano.

DISCUSION.

En el presente trabajo se pueden identificar dos aspectos principales: la obtención y selección de cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* que expresan la capacidad de fermentar sacarosa y la caracterización cinética del transporte de este sustrato.

En un primer tratamiento mutagénico en medio sólido se obtuvieron cepas de *Salmonella typhimurium*, que utilizan lentamente sacarosa como única fuente de carbono y energía, tanto de la cepa F^- como de las cepas Hfr y F' (Fig. 2 y tabla I). Estas mutantes $Sac U^+$ lentas, presentaron consistentemente períodos largos en su fase de inducción cuando fueron crecidas en medio líquido con sacarosa como única fuente de carbono (Fig. 11) y requirieron de varios días de incubación en caja cuando fueron inoculadas en medio mínimo de sacarosa (Tabla I).

Posteriormente, mediante un segundo tratamiento mutagénico, pero ahora en medio líquido, se obtuvieron a partir de la cepa lenta F^- SMC-01 cepas que utilizaron rápidamente la sacarosa (Fig. 3) y de las cuales se seleccionó la

que presentó mayor velocidad de crecimiento, denominándose le SMC-11 (Tabla I). Estos resultados sugieren que se requieren de por lo menos dos pasos mutagénicos para que se obtengan clonas mutantes de rápida utilización de sacarosa. Resultados similares han sido presentados por otros investigadores como Lester y Bonner (1956) con *E. coli*, y Lin y sus colaboradores (Wu, Lin y Tanaka, 1968) trabajando con *Aerobater aerógenes*. La cepa SMC-11 presenta períodos en su fase de inducción mucho más cortos que las cepas lentas. En las figuras 9 y 11 se puede observar que el crecimiento de esta cepa en medio mínimo de sacarosa es muy similar al crecimiento de la misma en medio mínimo de glucosa, siendo el comportamiento característico de un crecimiento rápido.

Tanto las cepas Sac U⁺ lentas como las rápidas se comportaron como las cepas silvestres para la utilización de algunas fuentes de carbono probadas, tanto de la vía glicolítica o de compuestos del ciclo de Krebs (Tabla I), lo -- que indica que las mutantes no han variado significativa-- mente en su metabolismo para los compuestos probados.

Por otra parte, las cepas mutantes no mostraron cam-- bios significativos en su morfología colonial con respecto a sus cepas progenitoras cuando se crecieron en los medios de citrato de Simmons, agar S.S. y agar McConkey.

En la figura 11 se muestra que la cepa silvestre LT-2

no utiliza sacarosa como fuente de carbono y en la Tabla I se observa que las cepas Hfr y F' progenitoras de las respectivas mutantes Sac U⁺ no manifestaron por sí mismas la capacidad para crecer en sacarosa y dado que se requiere de por lo menos una mutación para la manifestación de esta actividad, se propone que dicha mutación sea clasificada como una mutación de ganancia (Clarke, 1974).

En los estudios realizados en el presente trabajo -- acerca del transporte de sacarosa, primeramente se determinaron algunas características de dicho sistema. En la figura 14 se muestra que el sistema de transporte de sacarosa se expresa con niveles altos sólo en la cepa SMC-11 que ha sido crecida en sacarosa y que tanto esta cepa, crecida en medio rico como la cepa silvestre LT-2 muestran niveles bajos en el transporte de sacarosa. Esto hace pensar que para que se expresen niveles altos en el transporte de sacarosa éste requiera ser inducido por sacarosa.

Los experimentos de competencia en el transporte de -sacarosa se realizaron utilizando células de la cepa SMC-11 inducidas en sacarosa y se encontró que el sistema de transporte de sacarosa no es capaz de transportar rafinosa, glucosa, maltosa, celobiosa o fructosa, aunque se encuentran 100 veces más concentrados que la U-(¹⁴C)-sacarosa (Fig. - 15). El hecho de que dicho sistema de transporte no sufra

competencia con otros disacáridos y trisacáridos estructuralmente relacionados con sacarosa, nos indica que el sistema de transporte caracterizado es muy específico para sacarosa.

Ciertamente, la capacidad de utilizar sacarosa es un carácter atípico en *Salmonella*, esta eventualidad es rara por lo que se tienen pocos reportes en la literatura. Sin embargo, Le minor y sus colaboradores (1973) reportan que algunas cepas de *Salmonella* poseen plásmidos que pueden -- transferir mediante conjugación el carácter Sac U⁺, pero -- que otras cepas de *Salmonella* con fenotipo Sac U⁺ no lo -- pueden transferir. Con el objeto de investigar si la in-- formación genética que confiere a las mutantes Sac U⁺ di-- cho fenotipo se encuentra en el cromosoma bacteriano se -- realizaron los experimentos de conjugación empleando donadoras con fenotipo Sac U⁺ y receptoras con marcadores cromosómicos, para tratar de localizar más precisamente el si tio de la lesión cromosómica causada por el proceso mutagénico.

En los intentos que se hicieron en este trabajo (Tablas IV y V) no se obtuvieron recombinantes con ninguna de las cepas Hfr o la F' con fenotipo Sac U⁺ adquirido mediante un proceso mutagénico con NG. Estos resultados pueden ser explicados de dos formas diferentes: primero, que el -

segmento de DNA que codifica para la fermentación de sacarosa no pudo ser transferido por estas cepas, lo cual apoyaría los reportes de Le Minor y sus colaboradores (1973); o, segundo, porque no se forman "pares conjugantes" debido tal vez a que durante el proceso mutagénico se pudieron modificar los lipopolisacáridos de la pared celular de las cepas donadoras, estos resultados son frecuentes como lo muestran en la literatura los trabajos de Sanderson y colaboradores (1981) y los publicados por Glowacka y Derylo (1981).

Dado que los intentos para obtener recombinantes mediante conjugación fueron infructuosos, se intentó determinar la posición de la marca para la utilización de sacarosa mediante transducción generalizada con los fagos P-22 y ES-18.

Para realizar la transducción de la marca Sac U⁺, primeramente se proliferaron los bacteriófagos en la cepa Sac U⁺ rápida SMC-11. Los intentos de proliferación del fago P-22 en esta cepa fueron totalmente infructuosos, por ello se procedió a emplear el bacteriófago ES-18. Este fago sí presentó capacidad para proliferar en la cepa donadora, -- sin embargo, los títulos de los lisados fágicos mostraron valores bajos en el primer pase y en un segundo pase el título aumentó muy poco, no pudiendo ser aumentado en posteriores experimentos.

Pese a que el título del bacteriófago E5-18 no era el deseado, se intentó pasar la marca de la utilización de sacarosa a tres cepas del tipo Hfr: la K3, la K4, y la K5. Sin embargo, no se obtuvieron transductantes con ninguna de estas tres cepas. Esto se podría explicar apoyándose en los resultados obtenidos por Sanderson y sus colaboradores (1981), los cuales reportan que se requiere de la integridad del lipopolisacárido "O" que se encuentra en la superficie de la bacteria (Costerton *et al.*, 1974), para que los bacteriófagos puedan adherirse a la superficie celular y poder iniciar su ciclo proliferativo.

Con el fin de indagar si las mutantes habían desarrollado alguna actividad enzimática nueva para la utilización de sacarosa o se valían de enzimas que degradan normalmente otros substratos, se procedió a determinar la actividad de invertasa en los extractos libres de células, tanto de las cepas mutantes Sac U⁺ SMC-01 y SMC-11 como de su progenitora LT-2, ya que para metabolizar la sacarosa se tienen varias posibilidades: una es que la sacarosa fuera hidrolizada, mediante una sacarasa, obteniéndose como productos de esta reacción glucosa y fructosa, siendo estos compuestos metabolizados mediante las vías normales de la célula; o que la sacarosa sea primero fosforilada y posteriormente el compuesto fosforilado sea hidrolizado me--

diante la enzima 3-D-fructofuranósido fructohidrolasa, produciendo esta catálisis glucosa-6-fosfato y fructosa (Schmid *et al.*, 1982).

La actividad de sacarasa, en las condiciones empleadas en el presente estudio, no fue detectada en ninguna de las cepas mutantes ni en la cepa LT-2 (Tabla II), por lo que nuestra contribución en este estudio realza la hipótesis propuesta por el grupo de Schmid.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

1. Las cepas progenitoras de las mutantes Sac U⁺ utilizadas en este estudio no manifestaron por sí mismas la -- capacidad de utilizar sacarosa como única fuente de carbono y energía.

2. La cepa SMC 01 derivada de *Salmonella typhimurium* LT 2 mediante mutagénesis con NG utiliza sacarosa lentamente como única fuente de carbono y energía.

3. Dado que se requiere de por lo menos una mutación -- para que las cepas de *Salmonella* manifiesten la capacidad de utilizar sacarosa, se propone que dicha mutación sea considerada como una mutación de ganancia.

4. La cepa SMC 11 crece más rápidamente que la cepa -- SMC 01 progenitora cuando son inoculadas en medios conteniendo sacarosa como única fuente de carbono y energía.

5. Se requieren de dos pasos mutagénicos para que se -- obtengan cepas mutantes que manifiesten una rápida utilización de sacarosa.

6. Las cepas mutantes que utilizan sacarosa presentan mucha similitud en su crecimiento en glucosa con respecto a sus progenitoras.

7. Las cepas mutantes Sac U^+ no variaron significativamente en su metabolismo, tanto en la vía glicolítica como en el ciclo de Krebs.

8. Las cepas mutantes Sac U^+ no mostraron cambios significativos en su morfología colonial.

9. En las condiciones empleadas en el presente estudio la actividad de invertasa no fue detectada en los extractos libres de células obtenidos a partir de las cepas - LT 2, SMC 01 y SMC 11.

10. Los intentos para transferir la marca Sac U^+ mediante transducción con los bacteriófagos P22 y ES-18 fueron infructuosos.

11. El carácter atípico Sac U^+ no pudo ser transferido por ninguna de las donadoras Hfr o la F' mediante conjugación.

12. El sistema de transporte de sacarosa sólo se expresa con niveles altos en la cepa SMC 11 inducida en sacarosa.

13. Para que el sistema de transporte de sacarosa se exprese con niveles altos, requiere ser inducido por sacarosa o un derivado de ésta.

14. El sistema de transporte de sacarosa es muy específico para este carbohidrato.

15. La actividad específica del sistema de transporte de sacarosa fue de 44 n moles transportados/mg de peso seco bacteriano.

16. El sistema de transporte de sacarosa, no es capaz de transportar rafinosa, glucosa, maltosa, celobiosa o fructosa.

17. La presencia del carácter Sac U⁺ en una cepa de *Salmonella* puede ser motivo de una incorrecta clasificación bacteriológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelberg, E.A., M. Morton and G. Chein Ching Chen (1965) Optimal conditions for mutagenesis by N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18: 788-795.
- Alaeddinoglu, N.G., and H.C. Charles (1979) Transfer of a gene for sucrose utilization into *Escherichia coli* K-12, and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization. *J. Gen. Microbiol.* 110: 47-59.
- Alvarez de la Cuadra, J.J. (1979) Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México.
- Baron, L.S., P. Gemski, E.M. Johnson, and J.A. Wohlhieter (1968) Intergenetics bacterial matings. *Bacteriol. Rev.* 32: 362-369.
- Bolstein, D., and E.W. Jones (1969) Nonrandom mutagenesis of *Escherichia coli* genome by nitrosoguanidine. *J. Bacteriol.* 98: 847-848.
- Buchanann, R.E., and G.N. Gibbons (eds.) (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
- Carrillo-Castañeda, G., and M.V. Ortega (1967) Effect of inorganic phosphate upon *Salmonella typhimurium* phos-

phatase activities: non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 146: 535-543.

Carrillo-Castañeda, G. and M.V. Ortega (1970) Mutants of *Salmonella typhimurium* lacking phosphoenol pyruvate carboxy kinase and α -ketoglutarate dehydrogenase activities. *J. Bacteriol.* 102: 524-530.

Cerdá-Olmedo, E., P.C. Hanawalt and N. Guerola (1968) Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Mol. Biol.* 33: 705-719.

Clarke, P.H. (1974) The evolution of enzymes for the utilization of novel substrates. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 24: 183-217.

Cornelis, G., R.K.J. Luke, and M.H. Richmond (1978) Fermentation of raffinose by lactose fermenting strains of *Versinia enterolytica* and by sucrose-fermenting strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol. Chem.* 254: 249-252.

Costerton, J.W., J.M. Ingram, and K.J. Cheng (1974) Structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria. *Bact. Rev.* 38: 87-110.

Chassy, B.M., and E.U. Porter (1979) Initial characterization of sucrose-6-phosphate hidrolase from *Streptococcus mutants* and its apparent identity with intracellular invertase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 307-314.

Davis, B.D. and E.S. Mingioli (1950) Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamine B₁₂. *J. Bacteriol.* 60: 17-28.

Davies, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, W.B. Wood, y M. McCarty (1978) Tratado de Microbiología, Segunda Edición, Salvat Editores, Barcelona, España.

De la Garza, M. (1981) Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México.

Demerec, M. (1946) Induced mutations and possible mechanisms of the transmission of heredity in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32: 36-46.

Fischer, E.H., L. Kohtes, and J. Felling (1951) *Helv. Chim. Acta* 34: 1132.

Glowacka, M., and M. Derylo (1981) Effect of lipopolysaccharides on conjugation. *Acta Microbiologica Polonica* 30: 5-11.

Groves, W.E., F.C. Davis and B.H. Sells (1968) Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Analyt. Biochem.* 22: 195-210.

Harold, F.M. (1972) Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.* 36: 172-230.

- Harold, F.M. (1974) Chemiosmotic interpretation of active transport in bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 277: 297-311.
- Hayas, W. (1968) *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.S.A.
- Hays, J.B. (1978) Group translocation transport systems. (B.P. Rosen, ed.) *Bacterial Transport*. pp. 43-102. Marcel Dekker, New York.
- Hegeman, G.D. and S.L. Rosenberg (1970) The evolution of bacterial enzyme systems. *Ann. Rev. Microbiol.* 24: 429-462.
- Hestrin, S., D.S. Feingold and M. Scharamm (1955) Assay method of β -fructofuranosidase from yeast. *Methods in Enzymology* 1: 231-236.
- Howe, T.G.B., and G.W.P. Dawson (1969) Transduction of proto *Salmonella typhimurium* pro AB 47 by phage P 22. *J. Gen. Microbiol.* 58: 65-67.
- Jacob, F., and Wollman, E.L. (1958) Les épisomes éléments génétiques ajoutés. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 247: 154-222.
- Kunding, W., S., Ghosh, and S. Roseman (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52: 1067-1074.

- Lederberg, J., and E.L. Tatum (1946) Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11: 113-114.
- Lederberg, J. (1951) Citado por Hegeman, G.D. y S.L. Rosenberg, 1970.
- Ledereberg, J., and E.M. Lederberg (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63: 399-406.
- Lederberg, J. (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol. Rev. 32: 403.
- Lee, K., B. Gold and S.S. Mirvish (1977) Mutagenicity of 22 nitrosamides and related compounds for *Salmonella typhimurium* TA1535. Mutation Res. 48: 131-138.
- Le Minor, L., C. Coynault, R. Rhode, B. Rowe, and S. Aleksic (1973) Localisation plasmidique du déterminant génétique du caractère atypique 'saccharose' des *Salmonella*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 124B: 295-306.
- Lengeler, J., and E.C.C. Linn (1972) Reversal of the mannitol-sorbitol diauxie in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 112: 840-848.
- Lengeler, J., R. Mayer, and K. Schmid (1982) Phosphoenolpiruvate-dependent phosphotransferase system enzyme III and the plasmid-encoded sucrose transport in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 151: 468-471.

- Lester, G. and D.M. Bonner (1956) Genetic control of raffinose utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 73: 544-552.
- Mäkelä, P.H. (1963) Hfr males in *Salmonella abony*. *Genetics* 48: 423-429.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature (London)* 191: 144-149.
- Nishioka, Y.M. and A. Eistenstark (1970) Sequence of genes replicated in *Salmonella typhimurium* as examined by transduction techniques. *J. Bacteriol.* 102: 320-333.
- Novick, R.P., R.C. Clows, S.N. Cohen, R. Curtis III, N. Datta, and S. Falkow (1976) Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* 40: 168-189.
- Ortega, M.V. and C. Aguilar (1973) Biochemical and genetic characterization of a mutant of *Salmonella typhimurium* defective in a locus for glutamate dehydrogenase activity. *Mol. Gen. Genet.* 125: 351-358.
- Oxender, D.L. (1972) Membrane transport. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 777-811.
- Parada, J.L. and M.V. Ortega (1967) Growth inhibition by hexoses of a temperature sensitive thiazoleless mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 94: 707-711.
- Parada, J.L., M.V. Ortega and G. Carrillo-Castañeda (1973)

- Biochemical and genetic characteristics of the C₄-dicarboxylic acids transport systems of *Salmonella typhimurium*. Arch. Mikrobiol. 1-26:1-12.
- Perlman, R., and I. Pastan (1968) Cyclic 3'5'-AMP stimulation of β -galactosidase and tryptophanase induction in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: 656-664.
- Riley, M. and A. Anilionis (1978) Evolution of the bacterial genome. Ann. Rev. Microbiol. 32: 519-560.
- Roseman, S. (1969) The transport of carbohydrates by a bacterial phosphotransferase system. J. Gen. Physiol. 54: 138-180.
- Rosen, B.P. (1978) Bacterial Transport. Marcel Dekker, N.Y. pp. 559-620.
- Sanderson, K.E., and M. Demerec (1965) The linkage map of *Salmonella typhimurium*. Genetics 51: 897-913.
- Sanderson, K.E. (1972) Linkage map of *Salmonella typhimurium*. Bacteriological Reviews (Sixth Edition) 36: 558-586.
- Sanderson, K.E., H. Ross, L. Ziegler and P.H. Makälä (1972) F', Hfr and F' strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella abony*. Bact. Rev. 36: 608-637.
- Sanderson, K.E., Janzer, T., and Head, J. (1981) Influence of lipopolysaccharide and protein in the cell envelope on recipient capacity in conjugation of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 148: 283-293.

- Schmid, K., M. Schupfner and R. Schmitt (1982) Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 151: 68-76.
- Smith, H.W., and Z. Parsell (1975) Transmissible substrate utilizing ability in *Enterobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 87: 129-140.
- Stein, W.D. (1967) *The Movement of Molecules Across Cell Membranes.* Academic Press, N.Y.
- St. Martin, E.J., and C.L. Wittenberger (1979) Regulation and function of sucrose-6-phosphate hidrolase in *Streptococcus mutants*. *Infect. Immun.* 26: 487-491.
- Veron, M. and L. Le Minor (1975) Nutritium et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bacteries voisines. III. Caracteres nutritionals et diferenciation des grupes taxonomique. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 126B: 125-147.
- Watson, J.D., and Crik, F.H. (1953) Genetic Implications of the structure of desoxiribonucleic acid. *Nature* 171: 964-969.
- White, A., P. Handler, and E.L. Smith (1968) *Principles of Biochemistry.* Fourth Edition, McGraw-Hill Book Company. Kogakusha Company Ltd. Tokio. pp. 647-683.
- Wohlhieter, J.A., J.R. Lazare, N.J. Snellings, E.M. Johnson, R.M. Syneki, and L.S. Baron (1975) Characterization of transmissible genetic elements from sucrose fermenting *Salmonella* strains. *J. Bacteriol.* 122: 401-406.

Wu. T.T., E.C.C. Lin and S. Tanaka (1968) Mutants of *Aerobacter aerogenes* capable of utilizing xylitol as a novel carbon source. *J. Bacteriol.* 96: 447-456.

Zinder, N., and J. Lederberg (1952) Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 64: 679-699.

Zinder, N. (1960) Sexuality and mating in *Salmonella*. *Science* 131: 924-926.