

115
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**



FALLA DE ORIGEN

**"ESTUDIOS DE MUTAGENESIS EN
Salmonella typhimurium PARA LA UTILIZA-
CION DE B-GLICEROLFOSFATO"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ROSA ZONANA MALCA

Director de Tesis: Dra. Mireya De La Garza Amaya



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 está 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.

INDICE

	página
Abreviaturas utilizadas	iii
Indice de tablas	vi
Indice de figuras	vi
Resumen	vii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	10
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	11
IV. MATERIALES Y METODOS	12
MATERIALES	
1.- Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	12
2.- Conservación de las cepas bacterianas.	12
3.- Reactivos químicos	12
4.- Medios de cultivo y soluciones isotónicas.	13
5.- Soluciones para obtención de extractos totales de bacterias, electroforesis y doble tinción.	14
METODOS	
1.- Mutagénesis en medio sólido	17
2.- Mutagénesis en medio líquido (frecuencia de mutación inducida para la utilización de β -glicerolfosfato)	17
3.- Aislamiento de bacterias β^+	18
4.- Aislamiento de bacterias β^+ auxótrofas	18
5.- Frecuencia de mutación espontánea para la utilización de β -glicerolfosfato	19
6.- Cinéticas de crecimiento bacteriano	19
7.- Obtención de extractos totales de bacterias	20
8.- Electroforesis unidimensional en placa	20
9.- Doble tinción	22
V. RESULTADOS	
1.- Mutagénesis	23

1.1. Mutación para obtención de mutantes β^- auxótrofos (en medio sólido y líquido)	23
1.2. Mutagenesis en medio líquido para obtener la frecuencia de mutación inducida y espontánea para la zación de β -glicerolfosfato al 0.4%	27
2.- Cinéticas de crecimiento	29
2.1. Cinética de crecimiento en β -glicerolfosfato y en glicerol	29
2.2. Cinética de crecimiento en β -glicerolfosfato a diferentes concentraciones	31
3.- Electroforesis unidimensional en placa	38
VI. DISCUSION	43
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. BIBLIOGRAFIA	50

Abreviaturas utilizadas

ATP	Adenosin trifosfato
β°	Utilización de β -glicerolfosfato.
β^{-}	No utilización de β -glicerolfosfato.
β^{+a}	Utilización aerobia (pero no en microaerofilia) de β -glicerolfosfato.
β -gol-P	β -glicerolfosfato.
β^{-} lentas	Utilización lenta de β -glicerolfosfato.
β° rápidas	Utilización rápida de β -glicerolfosfato.
β -solo	β -glicerolfosfato.
Cas	Casaminoácidos.
DHAP	Fosfato de dihidroxiacetona
DNA	Acido desoxirribonucleico.
Ext. lev.	Extracto de levaduras.
F ⁻	Bacteria carente de factor sexual.
Gal ⁻	Fenotipo de no utilización de galactosa.
GAP	Gliceraldehido 3 fosfato

<i>glp A</i>	Gen que codifica para la L- α -glicerolfosfato deshidrogenasa (aeróbica).
<i>glp D</i>	Gen que codifica para la L- α -glicerolfosfato deshidrogenasa (anaeróbica).
<i>glp F</i>	Gen que codifica para la proteína de transporte facilitado del glicerol.
<i>glp K</i>	Gen que codifica para glicerol cinasa.
<i>glp Q</i>	Gen que codifica para la fosfodiesterasa.
<i>glp R</i>	Gen regulador del sistema <i>glp</i> .
<i>glp T</i>	Gen que codifica para el sistema de transporte del L- α -glicerolfosfato.
Hfr	Alta frecuencia de recombinación.
kDa	Kilo daltones.
kdp ⁻	Fenotipo de incapacidad de crecer a baja concentración de potasio en <i>Salmonella typhimurium</i> (<100 μ M).
Lac ⁻	Fenotipo de no utilización de lactosa.
Lac ⁺	Fenotipo de utilización de lactosa.
MPM	Marcadores de peso molecular.
NEM	N-etilmaleimida.

NG N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

PAGE-SDS Geles de poliacrilamida con SDS

PHMB para-hidroximercuribenzoato.

pho A Gen que codifica para la fosfatasa alcalina.

pho B Gen que codifica para regulador de fosfatasa alcalina

pho R Gen que codifica para regulador de fosfatasa alcalina

PMSF fenil-metil-sulfonyl fluoruro.

pur F Gen que codifica para amido fosforibosil transferasa.

SDS dodecil-sulfato de sodio.

SSE Solución salina esteril.

TEMED N,N,N',N'-Tetrametilendiamina.

ugp A Gen que codifica para el sistema de transporte de L- α -glicerolfosfato a bajas concentraciones.

ugp B Gen que codifica para proteína de unión del sistema de transporte de L- α -glicerolfosfato a bajas concentraciones.

Indice de testis

	Pagina
I. Mutagenesis inducida para la obtencion de β^+ auxotrofas	26
II. Frecuencia de mutacion espontanea para la utilizacion de β -glicerolfosfato al 0.4%	28
III. Frecuencia de mutacion inducida para la utilizacion de β -glicerolfosfato al 0.4%	28

Indice de figuras

1.- Metabolismo del glicerol y del L- α -glicerolfosfato en <i>Escherichia coli</i> .	6
2.- Bacterias mutantes β^+	25
3.- Cineticas de crecimiento en β -glicerolfosfato y en glicerol de cepas lentas y rapidas. comparado con las cepas silvestres.	30
4.- Bacterias SM-R1	32
5.- Cinetica de crecimiento de las cepas SM-R1 y SM-R11 a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato. comparado con la cepa SA-486	33
6.- Cinetica de crecimiento de las cepas SM-F4 y SM-F41 a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato. comparado con la cepa SA-5-0	34
7.- Cinetica de crecimiento de las cepas SM-R1 y SM-F4 provenientes de las concentraciones 0.25 y 2.0% de β -glicerolfosfato a estas mismas concentraciones.	36
8.- Cinetica de crecimiento de la cepa SA-540b a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato.	37
9.- Patrón electroforético de extractos totales de las cepas SA-540b, SM-F4 y SM-F41.	
9A.- Tincion de Coomassie	41
9B.- Doble tincion	42

Resumen

Por mutagénesis inducida con NG se lograron obtener mutantes que pueden utilizar β -glicerolfosfato como única fuente de carbono y energía, confirmando así, que la cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* LT2 no es capaz de utilizar dicho sustrato como única fuente de carbono y de energía. Primeramente se obtuvieron mutantes que lo utilizan lentamente y a partir de estas, en forma espontánea o mediante una segunda mutación, se obtuvieron mutantes que lo utilizaron rápidamente.

Se encontró que la frecuencia de mutación espontánea para la utilización de β -glicerolfosfato es de 4.24×10^{-12} y la de mutación inducida con nitrosoguanidina de 1.76×10^{-6} .

Se trató de obtener una mutante β^+ auxotrofa con el fin de que nos ayudara a localizar el gen o los genes responsables de utilización de β -glicerolfosfato. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales y con la cantidad de mutantes empleadas no se obtuvieron estas mutantes.

Mediante cinéticas de crecimiento, variando la concentración del sustrato en estudio, se observó que existe una presión selectiva del medio ya que la concentración del sustrato favorece el crecimiento de las mutantes.

Utilizando electroforesis unidimensional en placa, buscamos si habían diferencias específicas en las proteínas de inducción de β -glicerolfosfato. Logramos observar 4 proteínas de inducción de glicerol que se encontraron también presentes en la cepa rápida en β -glicerolfosfato con pesos moleculares de 76, 70, 40 y 26 kDa, sin embargo, no nos fue posible encontrar una proteína que sólo se encontrara inducida en β -glicerolfosfato.

1. INTRODUCCION

Los cambios morfológicos y funcionales tienen como base los cambios genéticos: la evolución biológica ocurre debido a que el material hereditario, el DNA, puede cambiar de generación en generación. La herencia es un proceso conservador, pero no completamente. La información hereditaria de las células está protegida de modo que se transmita inalterada a las generaciones futuras. Sin embargo, ocasionalmente, ocurren "errores" de tal manera que las células hijas difieren de las progenitoras en la secuencia o en la cantidad de DNA. Estos cambios del material genético se llaman mutaciones (Avala 1984).

Los microorganismos, particularmente las bacterias, tienen la capacidad, por medio de mutaciones, de adquirir nuevos fenotipos, incluyendo la capacidad de crecer en medios en los que no crecía su cepa parental; así como la capacidad de perder algunas funciones existentes (Clarke 1974).

La "evolución adquisitiva" se ha estudiado principalmente como la respuesta de utilización de nuevos sustratos no degradados normalmente por las cepas silvestres, encontrándose 4 formas principales mediante las cuales un microorganismo puede ganar esta nueva actividad (Hageman y Rosenberg 1970):

- a) Volviéndose constitutiva una enzima o permeasa antes inducible (pérdida de control enzimático).
- b) Cambio en la especificidad de la inducción de una enzima o grupo enzimático que posee alguna actividad hacia el nuevo compuesto (control enzimático mantenido).
- c) Disminución en la sensibilidad hacia metabolitos normalmente tóxicos, producidos a partir del nuevo sustrato.
- d) Adquisición de permeabilidad hacia un compuesto metabolizable, al cual las células progenitoras son impermeables.

Cuando algunas poblaciones de células están sujetas a una fuerte presión selectiva, aparecen variantes que llevan cambios en su secuencia de DNA, mostrando un cambio apropiado en el fenotipo. Si la selección se aplica a células creciendo en medio líquido, la población con el fenotipo original va a ser suplantada tarde o temprano por las mutantes: si las células son inmovilizadas en caja, las mutantes formarán colonias o papilas apareciendo sobre el resto de la población. El problema es determinar cuántas de estas mutantes están surgiendo como respuesta directa y específica a la presión selectiva (no hubieran ocurrido en su ausencia) y cuántas son espontáneas (hubieran aparecido aún en la ausencia de la selección) (Cairns 1968).

Luria y Delbruck fueron los primeros en intentar esta distinción. Ellos estudiaron el origen de las mutantes resistentes a fago que son encontradas cuando se plaquean cultivos de *E. coli*, en presencia del bacteriófago T1. Ellos consideraron 2 modelos: en el primero, se asume que las mutantes aparecen después de plaquear en respuesta al ataque por el bacteriófago; en este caso, las mutaciones deben ocurrir en una pequeña fracción de las bacterias expuestas al virus y el número de mutantes encontrado en cada gran grupo de cultivos independientes, debe formar una distribución de Poisson cuya media es el producto del número de bacterias plaqueadas y de la probabilidad de que una bacteria pueda volverse resistente antes de que sea destruida por el fago. En el segundo modelo, se asume que las mutantes aparecen espontáneamente, como resultado de un error en la replicación, y tienen una probabilidad constante de ocurrir en la vida de cada bacteria, en este caso los eventos mutacionales estarían distribuidos al azar entre cada cultivo y el número final de mutantes debería ser altamente variable porque no todos los cultivos sufrirán la mutación en la misma fase de crecimiento y algunos cultivos van, por casualidad, a sufrir una mutación temprana en su crecimiento y por lo tanto terminarán

conteniendo un gran número de mutantes. Cuando fueron puestos en presencia del fago, el número de mutantes resistentes a T1 fue muy variado de una muestra a otra encontrándose cultivos que contenían hasta 100 veces el valor de la media del grupo como un todo. Luria y Delbrück concluyeron que las mutaciones para resistencia al fago son el resultado de eventos espontáneos, que ocurren durante el crecimiento de los cultivos antes de que hayan sido expuestos a alguna selección (Luria y Delbrück, 1943). Sin embargo muchos biólogos consideraron el asunto todavía abierto. Menos de una década después J. y E. Lederberg utilizaron la réplica en placa para demostrar que se pueden aislar cultivos puros fago-resistentes sin exponer los cultivos al fago. De acuerdo con los resultados de Lederberg, las mutaciones aparecen aleatoriamente con el tiempo en cultivos en crecimiento, y la selección servía sólo para revelar la existencia de esas mutantes. Los experimentos se repitieron con una variedad de presiones selectivas y en una gran variedad de organismos, desde *E. coli*, hasta *Drosophila spp.*. En todos los casos las mutaciones ocurrieron en la ausencia de selección. De estos experimentos nació el dogma que mutación y selección son procesos completamente separados, y que las mutaciones aparecen sin importar que puedan causar un efecto benéfico o de supresión al organismo (Hall, 1991).

En 1988 Cairns y colaboradores señalaron que los experimentos anteriores habían empleado selección letal, en la cual hay un lag de varias generaciones entre la aparición de una mutación y la expresión fenotípica de dicha mutación. En el caso de la resistencia al fago, la célula no se vuelve resistente en el momento en que la mutación ocurre porque los receptores al fago en la superficie de la célula estaban todavía presentes. Son necesarias varias generaciones de crecimiento para diluir los receptores funcionales al fago antes de que la célula pueda sobrevivir la exposición al fago. Como resultado, las únicas mutaciones que pudieran haberse de-

tectado en aquellos experimentos eran mutaciones que ocurrieron varias generaciones antes de la exposición al fago; aunque el fago haya causado miles de mutaciones más, las mutaciones adicionales inducidas por el fago no hubieran podido detectarse debido a la resistencia genética pero fenotípicamente todavía sensible, por tanto, las células mutantes serían destruidas por el fago. Mientras los experimentos de Luria y Delbrück demostraron sin duda la aparición de mutación en ausencia de selección, excluyeron que algunas mutaciones puedan ser causadas por selección, señaló Cairns. Por lo que este autor seleccionó para su estudio mutaciones de expresión inmediata, donde la presión selectiva recompensa a las mutantes dejándolas multiplicarse y permite a las demás sobrevivir para que puedan por lo menos tener la oportunidad de sufrir una mutación dirigida. Una de estas mutaciones de expresión inmediata es la reversión a Lac⁺ de cepas de *E. coli*: Lac⁻. Cairns ofreció dos líneas principales de evidencia: primero, encontró que la distribución de mutantes revertantes Lac⁺ dentro de cultivos de una cepa Lac⁻ caían dentro de lo que era esperado de acuerdo al dogma y la distribución de Poisson si la selección causó la reversión. Segundo, las células Lac⁺ formaron colonias en medio mínimo de lactosa entre 1 y 2 días después de ser plaqueadas y fueron apareciendo mutantes adicionales cada día por varios días después de plaquear los cultivos Lac⁻. Esta producción de mutantes puede ser retardada plaqueando las células en medio carente de lactosa y luego proporcionando la lactosa varios días después. El patrón de aparición no cambió, siguieron apareciendo mutantes adicionales cada día después de la adición de la lactosa. Cairns señaló que estas apariciones tardías de revertantes Lac⁺ no pudieron haberse presentado cuando el cultivo fue plaqueado y que estaban siendo causadas por la presencia de la lactosa, la cual proporcionó una recompensa para reversión a Lac⁺ que permitió crecer a las células. Cairns llamó a esto "mutaciones directas" y sugirió que poblaciones de bac-

terias, en fase estacionaria, tienen alguna forma de producir (o selectivamente retener) solo las mutaciones más apropiadas (Cairns 1988).

En el laboratorio, una de las líneas de investigación es la utilización de β -glicerolfosfato por *Salmonella typhimurium*, ya que, a diferencia de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* LT2 no puede utilizar β -glicerolfosfato como única fuente de carbono y energía (Gutnick y col. 1969); *E. coli* cuenta con una fosfatasa alcalina [monoésterfosfohidrolasa ortofosfosfórica (E.C.3.1.3.1.)] que lo convierte a glicerol. Esta enzima es producida en el citoplasma y luego es segregada al espacio periplásmico (Heppel y Brockman, 1968). El gen estructural ha sido localizado en el minuto 9 (*pho A*) (Nakata y col. 1971) en el mapa cromosómico de Bachmann (1983) y la acción de este gen es controlada por dos genes reguladores: *pho B* y por *pho R*, también localizados en el minuto 9 (Yagii y col. 1975) (Echols y col. 1961).

En *Salmonella typhimurium* se ha encontrado una actividad de fosfatasa cuyo pH óptimo es de 9.0 pero que difiere de la reportada en *E. coli* en que no es reprimible en presencia de altas concentraciones de fosfato inorgánico en el medio de cultivo, es dependiente de la fuente de carbono usada para crecer las células, y no es estable al calor. Esta actividad es muy baja si se compara con la de *E. coli* (Carrillo-Castafeda y Ortega, 1967).

Ambas bacterias pueden utilizar directamente el L- α -glicerolfosfato el cual es un intermediario en el metabolismo aeróbico del glicerol y entra a la célula gracias a la permeasa codificada por el gen *glp T* (Lin, 1976). En la figura 1 se muestra el esquema propuesto de utilización de glicerol y de L- α -glicerolfosfato (G3P) en *E. coli*. El glicerol externo puede penetrar a la célula por difusión, aunque existe una proteína facilitadora que ayuda al proceso (Sanno y col. 1968). En el interior el glicerol es fosfo-

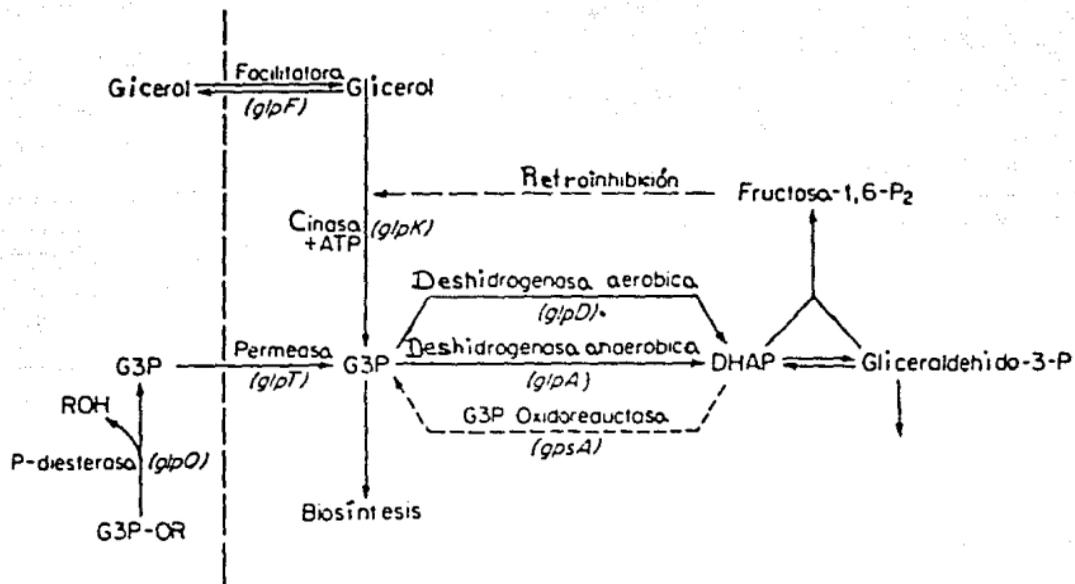


FIG. 1. METABOLISMO DE GLICEROL Y DE L- α -GLICEROLFOSFATO EN *E. COLI* (LIN 1987).

rilado por una cinasa dependiente de ATP (ATP glicerol-fosfo-transferasa E.C.2.7.1.30.) produciéndose el L- α -glicerolfosfato (Hayashi y Lin, 1965) el cual es oxidado a fosfato de dihidroxia-cetona (DHAP) por una deshidrogenasa ligada a citocromos (L- α -glic-erolfosfato E.C.1.1.99.5.) (Cozarelli y col. 1965), entrando así a la vía glicolítica a través del gliceraldehido 3-fosfato (GAP).

El sistema de utilización del glicerol es un regulon inducible en presencia de L- α -glicerolfosfato, el cual es el verdadero in-ductor y consta en *E. coli* de los genes siguientes:

- glp A* (min 49) codifica para la deshidrogenasa anaerobia (es un complejo con 2 subunidades una de 62 y otra de 43 kDa).
- glp D* (min 75) codifica para la deshidrogenasa aerobia (dímero de dos unidades de 58 kDa).
- glp F* (min 88) codifica para la proteína facilitadora del transporte de glicerol.
- glp K* (min 88) codifica para la glicerol-cinasa (tetramero de unidades de 55 kDa).
- glp Q* (min 49) codifica para la fosfodiesterasa (tetramero de unidades de 40 kDa).
- glp R* (min 75) codifica para la proteína reguladora de todo el sistema (33 kDa).
- glp T* (min 49) codifica para la permeasa de L- α -glicerolfos-fato (33 kDa).

Para *Salmonella typhimurium* LT2 se ha encontrado aparentemente el mismo mecanismo de utilización del glicerol y de la L- α -glice-rolfosfato (Aceves-Pifa y col. 1974), con posiciones homólogas a *E. coli* del regulon *glp*: *glp T* y *glp A* (min 45), *glp D* y *glp R* (min 74) y *glp K* (min 87) (Sanderson, 1988)

En *E. coli* se ha demostrado además un segundo sistema de transporte de L- α -glicerolfosfato codificado por los genes *ugp A* y *ugp B* localizados en el minuto 76 del cromosoma bacteriano, y que tiene una alta captación por el sustrato (5 μ M a diferencia de *glp*

7 que es de 12 μ m). Se trata de tres proteínas periplásmicas con características diferentes a la proteína de unión del sistema *glp T*. Este sistema de transporte no es inhibido por fosfato o fosfomicina (Argast y col. 1978)(Argast y Boos 1979).

Como se ha dicho *Salmonella typhimurium* no utiliza β -glicerol-fosfato como única fuente de carbono y energía; sin embargo, por mutación inducida, mediante un agente mutagénico, como es la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG), el cual causa predominantemente sustituciones de base, aunque también causa deleciones y mutaciones múltiples, se obtuvieron cepas que degradan lentamente dicho sustrato y de éstas se obtuvieron mediante una segunda mutagénesis con NG, o en forma espontánea, otro tipo de mutantes que son capaces de utilizarlo rápidamente.

En los dos tipos de mutantes la entrada del sustrato de ensayo parece ser mediada por el sistema de transporte del L- α -glicerol-fosfato y no por los sistemas de fosfato o por la proteína facilitadora del glicerol. En las cepas de crecimiento lento crecidas en β -glicerolfosfato se presenta inducido el sistema de utilización normal del glicerol, mientras que esto no sucede en las de crecimiento rápido, por lo que se infiere que en estas últimas la utilización del β -glicerolfosfato posiblemente se lleva a cabo por una vía metabólica diferente a la del glicerol.

Por experimentos de conjugación y de transducción, las lesiones genéticas que permiten la utilización tanto lenta como rápida del β -glicerolfosfato se localizaron en el minuto 46 del cromosoma bacteriano, ligado a *pur F* (min 47), y muy cercano al gen *glp T* (min 45) responsable de la síntesis de la proteína de transporte del L- α -glicerolfosfato; esta suposición se ve reforzada por el hecho de que existe competencia entre ambos sustratos para el transporte de uno de ellos en presencia del otro. (De la Garza 1981).

En este trabajo se encontraron las frecuencias de mutación espontánea e inducida, para la utilización lenta de β -glicerolfosfato en *Salmonella typhimurium* LT2, tanto sólo como con algún requerimiento (extracto de levaduras o casaminoácidos), con el fin de buscar cepas que además de utilizar β -glicerolfosfato tuvieran algún marcador de auxotrofia.

Una vez obtenida una mutante lenta, aparentemente es muy fácil obtener mutantes rápidas a partir de estas (De la Garza, 1981), por lo que se considero pertinente estudiar el crecimiento de las mutantes a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato, así como, por medio de electroforesis unidimensional en placa, observar diferencias entre ambos tipos de mutantes.

II. OBJETIVOS

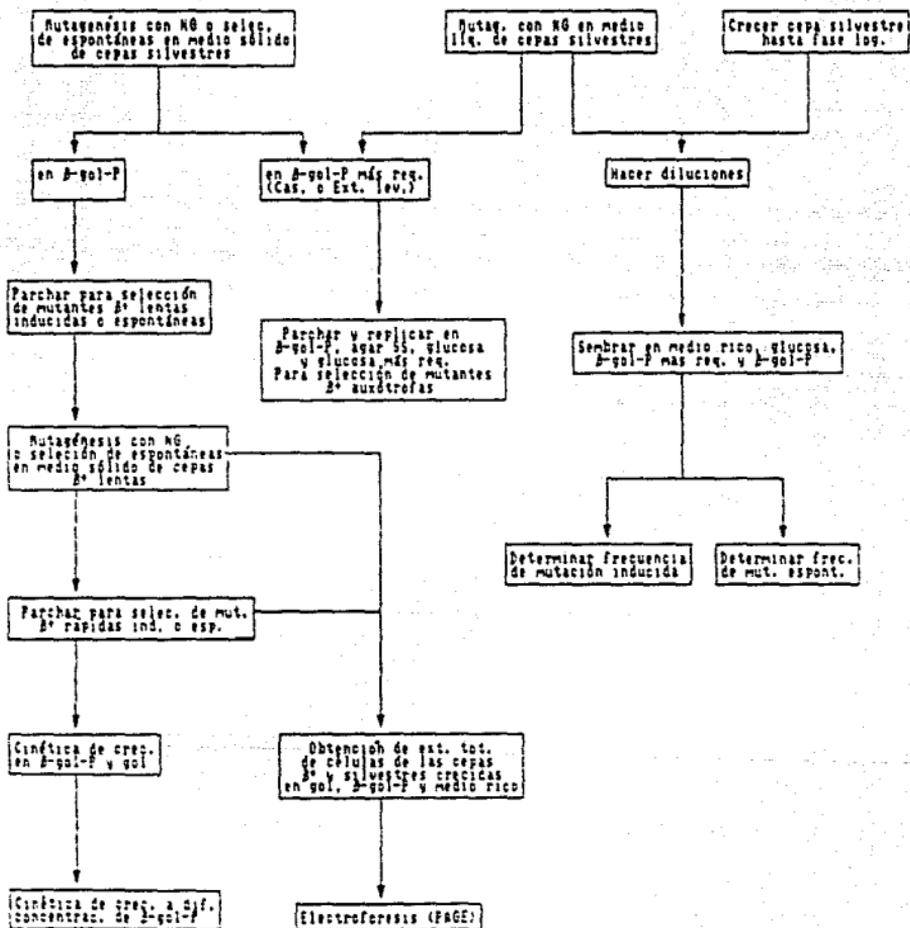
OBJETIVO GENERAL

- Determinar las frecuencias de mutación espontánea e inducida para la utilización de β -glicerolfosfato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de mutantes β^+ protótrofos.
- Obtención de mutantes β^+ con otras marcas (auxotrofia a aminoácidos, vitaminas o bases).
- Determinación de diferencias de crecimiento mediante cinéticas de crecimiento y patrón electroforético de mutantes β^+ lentas y rápidas.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IV. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES

1. Cepas de *Salmonella typhimurium*.

LT-2 (F^- , β^-) protótrofa, obtenida de la colección del Dr. M. Demerec.

SA-486 (Hfr. β^-) derivada de la LT2.

SA-540 (Hfr. β^-) derivada de la LT2.

SA-540b. (Hfr. β^{+a}) derivada de la SA-540

SM-R1 (F^- , β^+ lenta) derivada de SA-486 por mutagénesis con NG.

SM-R11 (F^- , β^+ rápida) derivada de SM-R1 por mutagénesis con NG.

SM-F4 (F^- , β^+ lenta) derivada de SA-540 por mutagénesis con NG

SM-F41 (F^- , β^+ rápida) derivada de SM-F4 por mutación espontánea.

2. Conservación de las cepas bacterianas.

Todas las cepas β^+ , lentas o rápidas, se conservaron en medio mínimo Davis N/10 con β -glicerolfosfato y agar, en cajas. Las cepas silvestres β^- se conservaron en medio rico.

3. Reactivos químicos.

NG.- K & K Laboratories Inc., Plainview, N.Y., E.U.A.

β -glicerolfosfato, glicerol, trizma base, pironina, glicina, PHMB, NEM, PMSF, SDS, azul de Coomassie G-250, marcadores de peso molecular SDS-6H de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo., E.U.A.

Fosfato monopotásico, cloruro de sodio, sulfato de amonio, glucosa, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, isopropanol, ácido acético glacial, etanol, metanol, dicromato de potasio, formol, ácido nítrico, de Baker Xalostec, México.

Sulfato de magnesio, nitrato de plata, carbonato de sodio, de Merck, Darmstadt, Alemania.

Agar bacteriológico, agar SS, extracto de levaduras, casaminoácidos, de Bioxón de México SA, Oaxaca, México.

Acrilamida y bisacrilamida, de LKB producter AB, Bromma, Suecia.

Persulfato de amonio, TEMED, β -mercaptoetanol, de Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA., EUA.

4. Medios de cultivo y soluciones isotónicas.

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

-El β -glicerolfosfato se esterilizó por filtración y se preparó en el momento de usarse.

-El glicerol y la glucosa se esterilizaron en autoclave aparte del medio, y se adicionaron al final.

-Las fuentes de carbono se prepararon al 10% (p/v); se adicionaron al medio de cultivo para tener una concentración final de 0.4% (p/v); excepto cuando se indicó otra cosa.

-Medios sólidos se adicionó agar 1.5% p/v.

-Todos los medios de cultivo llevan una solución amortiguadora de fosfatos con sales minerales y pH 7.0 denominado Davis N/10 con una concentración de fosfato de 0.00622 M, igualado al normal (Davis N .0622M) con trizma base-HCl, va que la concentración de fosfato inorgánico del medio de cultivo influye en el crecimiento de las mutantes β^+ (De la Garza 1981).

-Davis N/10:

KH_2PO_4	0.847 g
Trizma base	6.785 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g

Se ajustó el pH a 7.0 y se aforó a 1000 ml.

-Medio mínimo:

Davis N/10; con la fuente de carbono al 0.4%

-Medio rico:

Davis N/10; agar en las concentraciones dadas anteriormente y 0.2% (p/v) de casaminoácidos y de extracto de levaduras.

-Medio para aislamiento de bacterias β^+ :

Davis N/10 ; β -glicerolfosfato y agar.

-Medios para aislamiento de bacterias β^+ auxótrofas:

Davis N/10; β -glicerolfosfato; .005% (p/v) de casaminoácidos ó extracto de levaduras.

-Medios para frecuencia de mutación en placa:

Medio rico para cuenta total bacteriana; medio Davis N/10, β -glicerolfosfato y agar para cuenta de bacterias β^+ ; medio Davis N/10, β -glicerolfosfato, extracto de levaduras ó casaminoácidos (lo que llamamos requerimiento) para cuenta de bacterias β^+ auxótrofas.

-Medios para cinética de crecimiento:

Davis N/10 y la fuente de carbono que se especifique a la concentración indicada.

-Solución salina estéril (SSE):

NaCl al 0.85% (p/v) esterilizada en autoclave.

5. Soluciones para obtención de extractos totales de bacterias, electroforesis y doble tinción.

-Solución de Tris-HCl 0.0625 M, pH 8.5, e inhibidores de proteasas:

Se preparó por separado la solución de Tris-

HCl 0.0625 M, con 169.31 mg de Trizma-base adicionando HCl hasta llegar a un pH de 8.5. y se aforó a 25 ml con agua desionizada.

Los inhibidores de proteasas se prepararon por separado haciendo una solución patrón de cada uno 100 mM de la siguiente forma:

PHMB 0.03607 g -disuelto en 1 ml de Tris-HCl
NEM 0.01250 g -disuelto en 1 ml de Tris-HCl
PMSF 0.01760 g -disuelto en 1 ml de isopropanol.

La solución de Tris-HCl 0.0625 M, pH 8.5 se preparó al momento de usarse, quedando los inhibidores en las concentraciones: PHMB 10mM, NEM 5mM, PMSF 2mM.

-Amortiguador de muestra 2x:

Trizma-base	1.51 g
SDS	2.0 g
glicerol	25.0 g
pironina	0.002 g

Se ajustó el pH a 6.8 y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

-Amortiguador 4x pH 8.8 :

Trizma-base	9.0825 g	(1.5M)
SDS (20%)	1.0 ml	(0.4%)

Se ajustó el pH a 8.8, se aforó a 50 ml con agua desionizada, se pasó la solución a través de filtros millipore 0.45 µm.

-Amortiguador 4x pH 6.8 :

Trizma-base	3.0275 g	(0.5M)
SDS (20%)	1.0 ml	(0.4%)

Se ajustó el pH a 6.8. se aforó a 50 ml con agua desionizada y se filtró la solución con millipore 0.45 μ m

-Amortiguador de corrida 10x (pH 8.3) :

glicina	144.1 g
Trizma-base	30.2 g
SDS	10.0 g

Se disolvieron los componentes en agua desionizada y se llevó a 1000 ml con agua desionizada. La solución de trabajo se diluyó 10 veces (1x).

-Solución de acrilamida-bisacrilamida :

Acrilamida	60.00 g	(30%)
bisacrilamida	1.74 g	(0.87%)

Se disolvió en 200 ml de agua desionizada y se filtró con millipore de 0.45 μ m.

-El TEMED se preparó al 8.4% (v/v) y el persulfato de amonio al 12.5% (p/v)

-Solución de azul de Coomassie:

Se disolvieron 1.25 g de azul de Coomassie G-250 en 500 ml de una solución de metanol 40% -ácido acético 10%. agitando constantemente.

-Solución de dicromato de potasio 3.4 mM- ácido nítrico 0.0032 N:

Se agregaron 0.4 g de K_2CrO_7 con 0.0303 ml de ácido nítrico. Se aforó a 1 litro .

-Solución de nitrato de plata 0.012 M :

Se disolvieron 2.038 g de $AgNO_3$ en agua des-

ionizada y se aforó a 1 litro.

-Solución de carbonato de sodio 0.28 M :

Se disolvieron 29.67 g de Na_2CO_3 en agua desionizada, se agregaron 0.5 ml de formol y se aforó a 1 litro.

MÉTODOS.

1.- Mutagénesis en medio sólido.

Se creció en medio rico un cultivo de células de la cepa silvestre o de la mutante lenta (según fue el caso) hasta llegar a fase exponencial. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para cosechar las células, lavando una vez con SSE. Se suspendieron en SSE (5 ml) a concentración aproximada de 10^8 cél/ml. De esta suspensión se espatuló 0.1 ml por caja en medio de Davis N/10 con β -glicerolfosfato y agar; y en cajas Davis N/10 con β -glicerolfosfato, agar, casaminoácidos ó extracto de levaduras. 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 .

2.- Mutagénesis en medio líquido. (Frecuencia de mutación inducida para la utilización de β -glicerolfosfato).

Se dejó crecer la cepa de toda la noche en medio rico. Se cosechó y se lavó con SSE, suspendiendo luego el cultivo en SSE (5 ml) a una concentración aproximada de 10^8 cél/ml. Se inoculó de esta suspensión en medio rico a una absorbancia de 0.08, se llevó el cultivo a 0.2 de absorbancia (fase logarítmica) incubando a 37°C en agitación. Se agregó el mutágeno NG a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (p/v) en el cultivo. Se dejó en agitación el cultivo a 37°C por 30 minutos, siguiéndose las condiciones indicadas por

Adelberg (1965). Después se cosechó y se hicieron dos lavados con SSE, se resuspendió todo el cultivo en medio rico (50 ml aproximadamente) y se llevó a una absorbancia de alrededor de 1.2 hasta llegar a fase estacionaria (periodo de recuperación). Se cosechó y se lavó con SSE dos veces; se hicieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-8} con SSE.

Se sembró 0.1 ml por espatulado y por triplicado de la siguiente forma:

medio(cajas)	dilución
rico	$10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}$
glucosa	$10^{-6}; 10^{-7}; 10^{-8}$
β -glicerolfosfato	$10^{-2}; 10^{-2}; 10^{-4}$
β -glicerolfosfato-casaminoácidos	$10^{-4}; 10^{-5}$
β -glicerolfosfato-ext. levaduras	$10^{-4}; 10^{-5}$

Las cajas se dejaron en incubación a 37°C . Las cajas de medio rico y de glucosa se contaron a las 24 horas y se sacó el promedio; las cajas de β -glicerolfosfato y las de β -glicerolfosfato más el requerimiento se contaron a los 6 días.

3.-Aislamiento de bacterias β^+ .

Las mutantes lentas se obtuvieron por mutación con NG a partir de un cultivo de las cepas SA-486 y SA-540. Entre los 8 y 11 días, se tomó cada colonia con un palillo estéril y se sembró por parchado en el medio de Davis N/10- β -glicerolfosfato-agar, se incubaron las cajas a temperatura de 37°C .

Para la obtención de las mutantes de crecimiento rápido se siguió el mismo protocolo de mutación en medio sólido, pero a partir de una cepa lenta. Las colonias se aislaron y se parcharon en la misma forma ya descrita, entre las 48 y 72 horas de incubación.

4.-Aislamiento de bacterias β^+ auxótrofas.

El aislamiento de las mutantes " β^+ auxótrofas" obtenidas

apartir de las cepas SA-486 y SA-540 fue igual que el descrito anteriormente para las mutantes β^+ , en esta ocasión después de que se parcharon en medio Davis N/10 β -glicerolfosfato-extracto de levaduras ó casaminoácidos (según fue el caso); y se dejaron en incubación a 37°C de 6 a 8 días, se replicaron en placa de acuerdo a la técnica descrita por Lederberg y Lederberg (1952), en los siguientes medios:

Agar 55

β -glicerolfosfato con requerimiento.

glucosa

glucosa con requerimiento.

Se dejaron las cajas en incubación a 37°C 24 horas y se leyeron al día siguiente.

5.-Frecuencia de mutación espontánea para la utilización de β -glicerolfosfato.

Se puso a crecer la cepa silvestre LT2 en medio rico hasta llegar a fase logarítmica. Se cosechó y se lavó con SSE; se resuspendió en SSE (5 ml, absorbancia 1.4). Se hicieron diluciones hasta 10^{-9} y se sembró por espatulado y por triplicado 0.1 ml sin dilución (10^0) en 10 cajas de β -glicerolfosfato; de las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} en glucosa y en medio rico; de las diluciones 10^{-4} , 10^{-7} en β -glicerolfosfato-extracto de levaduras y en β -glicerolfosfato-casaminoácidos. Se incubaron las cajas a 37°C; las cajas de medio rico y glucosa se leyeron a las 24 horas de incubación, las de β -glicerolfosfato y las de β -glicerolfosfato con requerimiento se leyeron a los 8 días.

6.-Cinéticas de crecimiento bacteriano.

Preparación de inóculos.

Las condiciones empleadas fueron básicamente las indicadas por Parada y Ortega (1967).

Las células se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación. Los inóculos se prepararon en medio rico. Las células se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente a 5000 rpm por 5 minutos, se lavaron y se resuspendieron en SSE.

Las células lavadas se distribuyeron en matraces nefelométricos de 300 ml equipados con tubo lateral de 19 mm de diámetro, con 50ml del medio de cultivo (que se especificara en los resultados). Las bacterias se incubaron aeróbicamente a 37°C en un agitador rotatorio 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, usando un espectrofotómetro Coleman Jr. Se procuró que la lectura inicial (inóculo) fuera entre 0.08 y 0.1 unidades de absorbancia.

7.-Obtención de extractos totales de bacterias.

Las condiciones empleadas fueron básicamente las indicadas por Graeme-Cook y colaboradores (1989).

Se cultivaron las cepas en matraces nefelométricos de 300 ml equipados con tubo lateral de 19 mm de diámetro, con 50 ml de medio de cultivo (medio rico, β -glicerolfosfato 0.4% (p/v), o glicerol 0.4% (p/v)), hasta llegar a fase exponencial (0.6 de absorbancia (6 μ g de proteína/ μ l)).

Se tomaron 3 ml del matraz, se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf Geratebau Centrifuge 5412, por 5 minutos. Se juntaron las pastillas resuspendiéndolas con 62.5 μ l de Tris-HCl 0.0625 M (pH 8.5) más inhibidores de proteasas y 62.5 μ l de buffer de muestra. Se hirvió por 5 minutos y se centrifugó por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se agregó entre 5-10% de β -mercapto-etanol y se hirvió 1 minuto.

8.-Electroforesis unidimensional en placa (SDS-PAGE)

Se cargaron geles de electroforesis SDS-poliacrilamida al 12%

(30/0.87 acrilamida/bisacrilamida) de acuerdo a lo indicado por Laemmli (1970).

Gel tapón (fondo) :

Acrilamida-bis	1.0 ml
agua desionizada	0.5 ml
Temed	25 μ l
persulfato de amonio	50 μ l

Gel separador :

Amortiguador pH 8.8	5.0 ml
Acrilamida-bis	7.51 ml
agua desionizada	7.49 ml
Temed	100 μ l
persulfato de amonio	200 μ l

Se agregó isopropanol al gel para evitar la formación del menisco, se metió el peine para que al polimerizar el gel quedaran separadas las placas. Al secar se lavó muy bien el isopropanol.

Gel concentrador :

Amortiguador pH 6.8	1.5 ml
Acrilamida-bis	1.0 ml
agua desionizada	3.5 ml
Temed	40 μ l
persulfato de amonio	80 μ l

El peine se sacó hasta que el gel estuvo en la cámara con el amortiguador de corrida.

Los geles se cargaron con 20 μ l de muestra por carril y 10 μ l de marcadores de peso molecular SDS-6H. Y se corrieron alrededor de 4 horas a 100 volts, utilizando una fuente de poder LKB-Bromma-2301 macrodrive 1 .

9.-Doble tinción

La técnica empleada fue básicamente la indicada por Moreno R. y colaboradores (1985).

a) Se sumergieron los geles de electroforesis 3 veces por 20 minutos en solución de metanol 40%- ácido acético 10% (400ml/gel).

b) Se tificaron con azul de Coomassie G-250 por 30 minutos (200ml/gel).

c) Se destiftó durante 5 periodos de 10 minutos en solución metanol 40%- ácido acético 10% (400 ml/gel).

d) Se sumergieron 2 veces durante 10 minutos en solución etanol 10% -ácido acético 5% .

Uno de los geles se detuvo aquí, se puso en agua desionizada.

El otro gel continuó con los siguientes pasos:

e) Se sumergió por 10 minutos en dicromato de potasio 3.4 mM- ácido nítrico 0.003 N (200 ml/gel).

f) Se lavó con agua desionizada 3 veces 10 minutos (400 ml/gel).

g) Se sumergió por 30 minutos en solución de nitrato de plata 0.012 M (200 ml/gel).

h) Se lavó con agua desionizada por 2 minutos (400 ml/gel).

i) Se reveló 3 veces con solución de carbonato de sodio 0.25M -formol 0.5 ml por litro , durante 2 minutos las veces necesarias hasta que la tinción fue nítida, cuidando que no se obscureciera demasiado (200 ml/gel)

j) Se detuvo la reacción con solución de ácido acético al 5% por 5 minutos. Después se puso el gel en agua desionizada.

V. RESULTADOS

1.-Mutagenesis.

La NG es un mutageno poderoso con condiciones de alta sobrevivencia en bacterias (Adelberg 1965), actúa en las bases expuestas de las cadenas de DNA en replicación, por tanto, su acción es específica del sitio y momento de duplicación, conocido como punto de replicación del genoma bacteriano (Cerdeja-Olmedo y col. 1968, Bolstein y Jones, 1969). Es posible mediante un sólo tratamiento obtener mutantes afectadas en dos ó más genes, generalmente muy cercanos.

Se obtuvieron las cepas β^+ lentas mediante un sólo tratamiento con NG, estas cepas aparecieron entre los 7 y 11 días de incubación; de esta forma fueron obtenidas las cepas SM-R1 (β^+ lenta) a partir de la cepa SA-486; y la SM-F4 (β^+ lenta) a partir de la cepa SA-540.

La cepa SM-R11 (β^+ rápida) se obtuvo a partir de una mutación con NG en medio sólido de la cepa SM-R1, en este caso las cepas rápidas empezaron a aparecer entre las 48 y 72 horas de incubación.

La cepa SM-F41 es una mutante espontánea de crecimiento rápido en β -glicerolfosfato, derivada de la cepa SM-F4 (β^+ lenta).

Se realizaron varias mutaciones tanto en medio sólido como líquido con el β -glicerolfosfato al 0.4% tratando de obtener una mutante rápida de una sola mutación, pero se obtuvieron sólo lentas.

1.1. Mutación para obtención de mutantes β^+ auxotrofas (en medio sólido y líquido).

Para obtener mutantes vecinales β^+ , con alguna auxotrofia, con el fin de que nos ayudaran posteriormente a encontrar el gen o los genes responsables de la utilización de β -glicerolfosfato, se realizaron varias mutaciones, tanto en medio sólido como líquido.

agregando al medio Davis N/10, β -glicerolfosfato y un requerimiento (casaminoácidos o extracto de levaduras) en un principio a una concentración de 0.01% p/v. después bajando la concentración a 0.005%. En la figura 2 se observan las colonias obtenidas de una mutagénesis de la cepa silvestre, realizada en medio sólido con β -glicerolfosfato más requerimiento. Tanto en este caso como sin requerimiento las colonias aparecieron alrededor del halo de inhibición. Los resultados de estas mutaciones se muestran en la tabla I.

De un total de 14 mutaciones que se hicieron en medio con β -glicerolfosfato más requerimiento, 8 en medio sólido y 6 en medio líquido, se parcharon 4333 colonias (1762 para casaminoácidos y 2571 para extracto de levaduras) las cuales se replicaron posteriormente en cajas de agar SS, β -glicerolfosfato con requerimiento, glucosa y glucosa con requerimiento, no se encontró alguna cepa que tuviera auxotrofia. Se observó que las colonias crecían un poco más con el requerimiento el cual sólo favorecía un poco a su crecimiento.

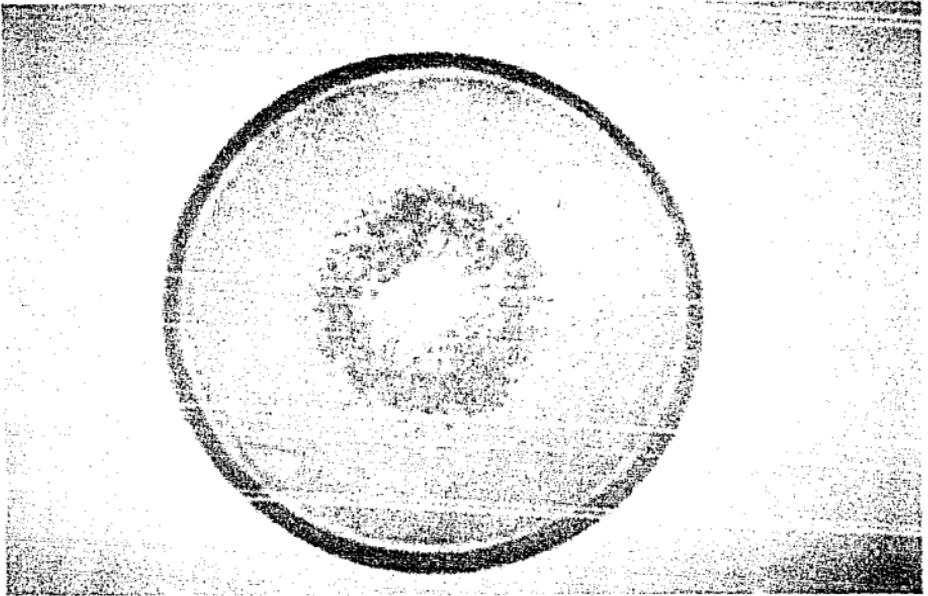


FIG. 2. BACTERIAS MUTANTES β^+

Las células de la cepa silvestre se cultivaron hasta fase exponencial en caldo rico, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con SSE. Se resuspendieron y se sembraron por espatulado en cajas con Davis N/10, β -glicerolfosfato (0.4%), casaminoácidos (0.01%) y agar. Sobre la superficie se colocaron unos cristales de NO y se incubaron a 37 C durante varios días. Las colonias aparecieron alrededor del halo de inhibición.

TABLA I. MUTAGENESIS INDUCIDA PARA LA OBTENCIÓN DE H^+ AUXOTROFAS

Mutagenesis en medio sólido

Nº mutación	colonias parchadas en cas. (0.01%)	colonias parchadas en ext.lev. (0.01%)
1	156	-
2	47	-
3	468	-
4	-	416
5	-	364
6	-	364
	en cas. (0.005%)	en ext.lev. (0.005%)
7	494	196
8	520	498
subtotal	1685	1840

Mutagenesis en medio líquido

Nº. mutación	colonias parchadas en cas. (0.01%)	colonias parchadas en ext.lev. (0.01%)
1	-	390
2	-	102
3	-	50
	en cas (0.005%)	en ext.lev. (0.005%)
4	-	110
5	52	54
6	25	25
subtotal	77	731
total	1762	2571

1.2. Mutagénesis en medio líquido para obtener la frecuencia de mutación inducida y espontánea, para la utilización de β -glicerolfosfato al 0.4%.

Con el fin de investigar que tan frecuente es obtener una mutante para la utilización de β -glicerolfosfato y si existe algún aumento de esta frecuencia con la ayuda de casaminoácidos o extracto de levaduras, se calculó la frecuencia de mutaciones inducida y espontánea para la utilización de dicho compuesto, a partir de la cepa LT2. Esto se logró contando el número de células en medio rico (crecen todas las células viables); glucosa (crecen todas las prototofas); β -glicerolfosfato (crecen las β^+ prototofas); β -glicerolfosfato más extracto de levadura (crecen todas las β^+ auxotofas y β^+ prototofas); β -glicerolfosfato más casaminoácidos (crecen β^+ auxotofas a aminoácidos y β^+ prototofas).

Para calcular la frecuencia de mutación, se dividió el número de células que aparecieron en β -glicerolfosfato como única fuente de carbono, entre el número de células en medio rico. Lo mismo se hizo para β -glicerolfosfato-requerimiento.

Los resultados se muestran en las tablas II y III.

La frecuencia de mutación espontánea para la utilización de β -glicerolfosfato al 0.4% es del orden de 6 exponentes menor que para la mutación inducida. La frecuencia de mutación tanto espontánea como inducida para la utilización de β -glicerolfosfato más requerimiento, varía con respecto a la de β -glicerolfosfato sólo siendo siempre mayor la de β -glicerolfosfato con casaminoácidos. estas variaciones son más evidentes en la mutación inducida, siendo alrededor de 2.2 veces mayor la frecuencia para β -glicerolfosfato con extracto de levaduras, y de 2.8 veces mayor la de β -glicerolfosfato con casaminoácidos (ambas con respecto a β -glicerolfosfato sólo).

TABLA II. FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA PARA LA UTILIZACION DE β -GLICEROLFOSFATO AL 0.4%

Medio	No. Células (/ml)	Frecuencia
Rico	1.38×10^{12}	-
Glucosa	1.25×10^{12}	-
Auxótrofas	-	9.42×10^{-2}
β -sólo	58.5	4.24×10^{-12}
β -ext. lev.	70	5.14×10^{-12}
β -cas.	80	5.79×10^{-12}

TABLA III. FRECUENCIA DE MUTACION INDUCIDA PARA LA UTILIZACION DE β -GLICEROLFOSFATO AL 0.4%

Medio	No. Células (/ml)	Frecuencia
Rico	3.07×10^{11}	-
Glucosa	2.98×10^{11}	-
Auxótrofas	-	2.93×10^{-2}
β -sólo	5.40×10^3	1.76×10^{-6}
β -ext. lev.	1.02×10^6	3.91×10^{-6}
β -cas.	1.50×10^6	4.89×10^{-6}

* este valor fue calculado dividiendo la diferencia de células crecidas en medio rico y de glucosa, entre el número de células crecidas en medio rico.

2.-Cinéticas de crecimiento.

2.1. Cinética de crecimiento en β -glicerolfosfato y glicerol.

La cinética de crecimiento de las cepas SM-R1 (β^+ lenta) y SM-R11 (β^+ rápida), en β -glicerolfosfato y en glicerol, se muestra en la figura 3A; comparando con la cepa silvestre LT2, que no utiliza el β -glicerolfosfato. Las fuentes de carbono estaban al 0.4% en el medio.

En la figura 3B se muestra la cinética de crecimiento de las cepas SM-F4 (β^+ lenta) y SM-F41 (β^+ rápida) en β -glicerolfosfato y en glicerol, comparado con la cepa SA-540, que no utiliza β -glicerolfosfato. En este caso las fuentes de carbono estaban al 0.4% y al 0.2% respectivamente en el medio.

Como se observa, en β -glicerolfosfato, la cepa SM-R1 (β^+ lenta) tiene un periodo de inducción mayor que el de la cepa SM-R11 (β^+ rápida), y un crecimiento lento que se manifiesta en un aumento aproximado de 0.015 a 0.02 unidades de absorbancia por hora; en un tiempo de 8 horas no ha completado su cinética. En cambio, la cepa SM-F4 (lenta), muestra una cinética de crecimiento mucho más lenta que la de la cepa SM-R1; en este caso manifiesta un aumento aproximado de 0.005 unidades de absorbancia por hora.

A diferencia de lo observado en las cepas lentas, las cepas rápidas SM-R11 y SM-F41 tienen una fase de inducción menor, manifiestan una cinética de franca utilización y en 8 horas ya han completado su cinética.

El crecimiento de las mutantes en glicerol, fue normal para ambos tipos de células.

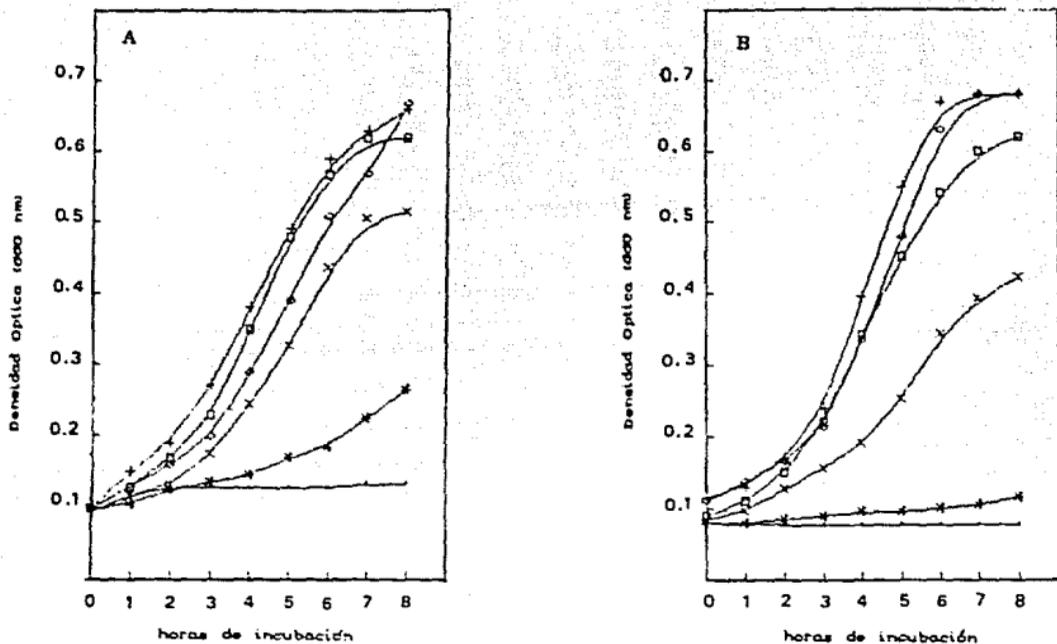


FIG. 9. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN β -GLICEROLFOSFATO Y EN GLICEROL DE CEPAS LENTAS Y RÁPIDAS COMPARADO CON LAS CEPAS SILVESTRES.

Los inóculos se crecieron toda la noche en 50ml de medio rico. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron 1 vez con SSE y se pasaron a Davis N/10 con β -glicerolfosfato (0.4%) (50ml de medio). A: LT2 (cepa silvestre). SM-R1 (β lenta). SM-R11 (β rápida); B: SA-540 (cepa silvestre). SM-F1 (β lenta). SM-F11 (β rápida). Cepa silvestre en β -gol-P (—), gol. (—); β lenta en β -gol-P (—), gol. (—); β rápida en β -gol-P (—), gol. (—).

2.2. Cinética de crecimiento en β -glicerolfosfato a diferentes concentraciones .

Se observó que las cepas lentas tienden con el tiempo a volverse rápidas; la cepa SM-R1, con la que se trabajó al principio demostró un comportamiento así, dando cultivos mixtos de colonias lentas y rápidas para la utilización de β -glicerolfosfato como se muestra en la figura 4; de igual forma, las cepas lentas que se tenían guardadas en el cepario se probaron y ya se habían seleccionado mutantes rápidas. Por lo que se decidió ver si también la concentración de la fuente de carbono tiene una influencia en el comportamiento de las mutantes.

Se trabajó a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato (0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 1.0%, 2.0%) posteriormente, después de que la cepa lenta completó su cinética, se cosecharon de las concentraciones 0.2% y 2.0%, se pusieron a crecer en medio rico por 2 horas; se cosechó, lavó, e inoculó nuevamente cada una al 0.2% y al 2.0%.

Las mutantes rápidas no mostraron ningún cambio debido a la concentración de la fuente de carbono; su cinética fue del mismo tipo para todas las concentraciones, sin embargo, parecería ser que a una concentración del 2.0% ya están un poco intoxicadas, ya que al 1.0% fue mejor su cinética, inclusive al 0.6% fue mejor para la cepa SM-F41. Esto se observa en las figuras 5B y 6B.

Para las cepas lentas, a medida que se aumenta la concentración de la fuente de carbono, se observa un ligero aumento en la pendiente de la curva de la cinética, este aumento se ve más claramente en la cepa SM-F4, sobre todo en las últimas horas de cinética (figura 6A), que en la cepa SM-R1, la cual, aunque tiene una fase de inducción mayor que la cepa rápida SM-R11 a las últimas concentraciones parecería tener una pendiente de mutante rápida (figura 5A). Cabe mencionar que puede ser que el cultivo de la cepa SM-R1 va era una mezcla de mutantes lentas y rápidas.

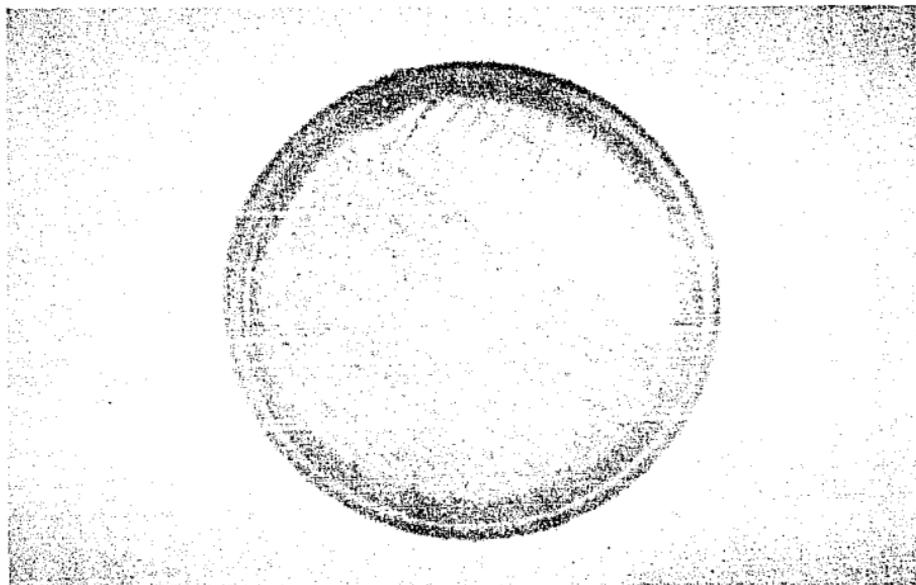


FIG. 4. BACTERIAS SM-R1

Las células de la cepa SM-R1 (β^+ lentas) se esluvieron resemebrando por estriado en medio sólido Davis N/10 y β -glicerolfosfato (0.4%).

Se observó que aparecieron cultivos mixtos de mutantes β^+ lentas y rápidas, las colonias grandes que se observan son mutantes β^+ rápidas que aparecieron a partir de la SM-R1 (β^+ lenta); el crecimiento de fondo es la SM-R1 β^+ lenta.

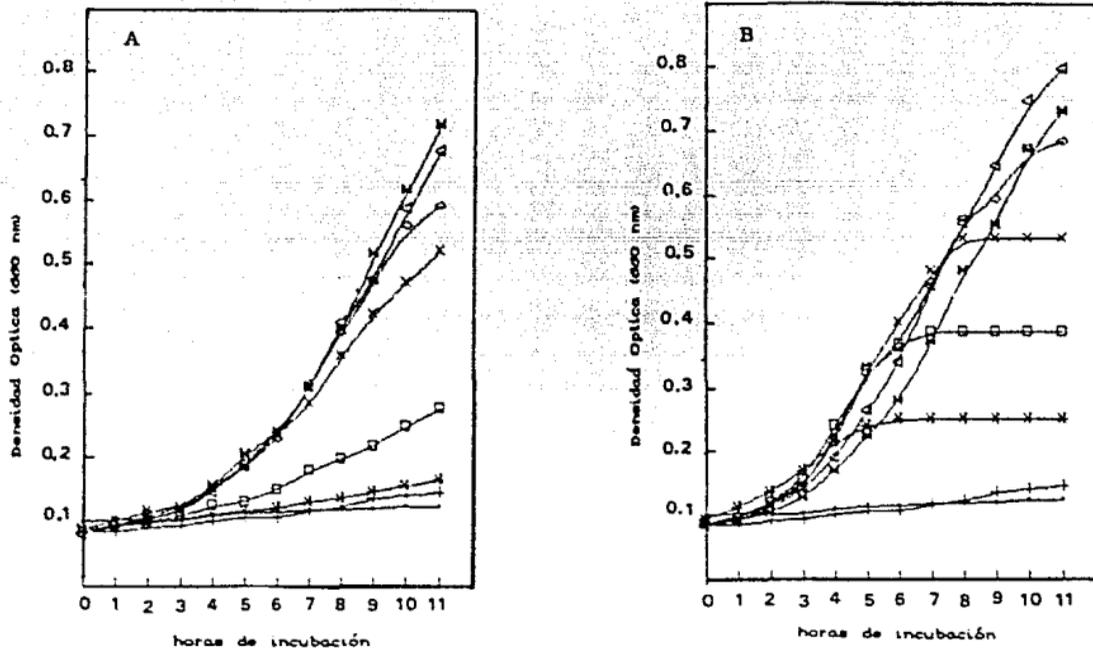


FIG. 5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SM-R1 Y SM-R11 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE β -GLICEROLFOSFATO, COMPARADO CON LA CEPA SA-480

Los inóculos se crecieron toda la noche en medio rico líquido (30ml). Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron 1 vez con SSE y se pasaron a Davis N/10 con β -glicerolfosfato a diferentes concentraciones. Se utilizó como testigo a la cepa SA-480.

A: SM-R1 (β lenta); B: SM-R11 (β rápida). SA-480 0.4% (—), 2.0% (+), 0.1% (—), 0.2% (—), 0.4% (—), 0.6% (—), 1.0% (—), 2.0% (—).

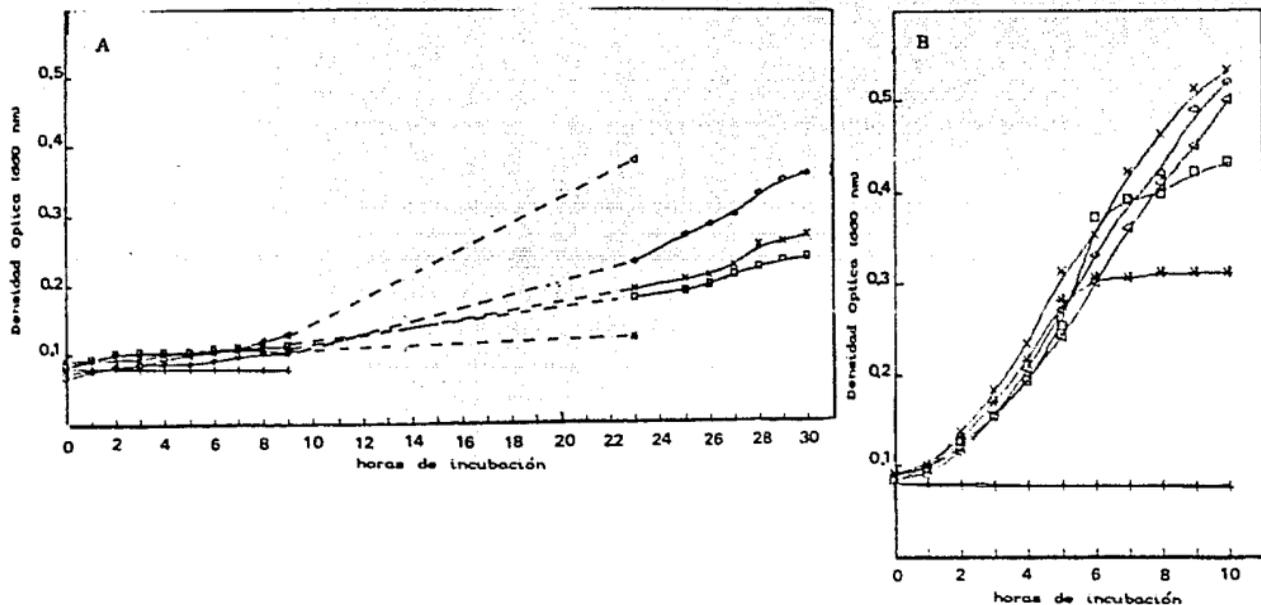


FIG. 6. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SM-F4 Y SM-F41 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE β -GLICEROLFOSFATO COMPARADO CON LA CEPA SA-540.

Los inóculos se crecieron toda la noche en medio rico líquido (30ml). Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con SSE y se pasaron a Davis N/10 con β -glicerolfosfato a diferentes concentraciones. Se utilizó como testigo la cepa SA-540. Las líneas punteadas fueron horas en las que no se registro lectura. A: SM-F4 (β lenta); B: SM-F41 (β rápida). SA-540 0.4% (—), 2.0% (—+); 0.2% (—•), 0.4% (—□), 0.0% (—+), 1.0% (—◇), 2.0% (—△).

En la figura 7A se observa que para la cepa SM-F4 aquellos inóculos provenientes de una concentración de 2.0% tienen un ligero aumento en su curva con respecto a los provenientes de la concentración al 0.2%. Sin embargo, en la figura 7B se observa como para la cepa SM-F4, va sea que provenga de la concentración al 0.2% o 2.0%, al reinocularlas a estas concentraciones, al 0.2% vuelve a disminuir la pendiente, y al 2.0% a aumentar.

Cuando se prepararon los extractos para los geles, se tomo una nueva clona de la cepa SA-540, la cual se observó que en aerobiosis (medio líquido) crecía muy lentamente en β -glicerolfosfato, similar a la cepa SM-F4; sin embargo en anaerobiosis (medio sólido, caja) no crecía. A esta cepa se le llamó SA-540b y su cinética a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato se muestra en la figura 8. Podemos observar que se comporta de manera muy similar a la cepa SM-F4 y dependiendo de la concentración de la fuente de carbono, tiene una mejor pendiente.

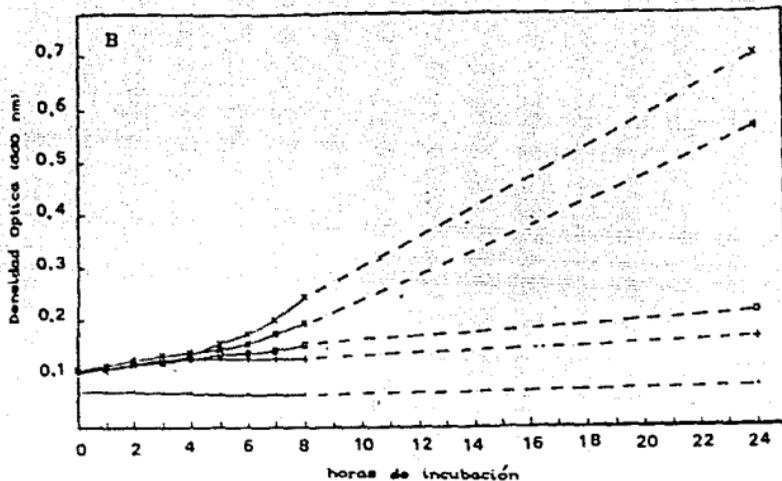
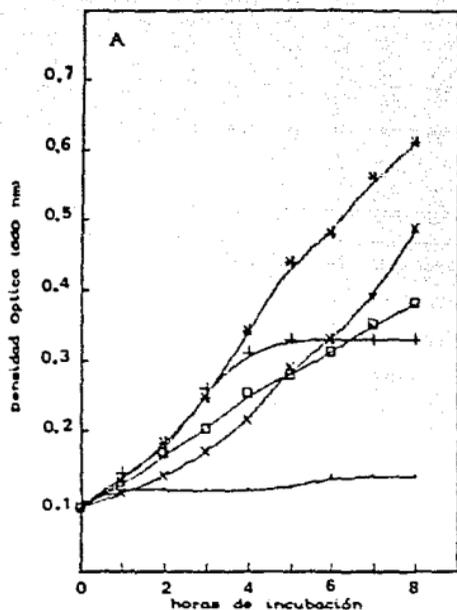


FIG. 7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SM-R1 Y SM-F4 PROVENIENTES DE LAS CONCENTRACIONES 0.2% Y 2.0% DE β -GLICEROLFOSFATO A ESTAS MISMAS CONCENTRACIONES.

Los inóculos provinieron de la cinética anterior de la cepa SM-R1 y SM-F4 a las concentraciones 0.2% y 2.0%. Las células se cosecharon por centrifugación, se crecieron en caldo nutritivo una hora y se volvieron a cosechar; se lavaron con SSE, luego se pasaron a Davis N. 10 con β -glucosilfosfato al 0.2% y al 2.0%. Se utilizaron como testigos las cepas SA-480 y SA-540 respectivamente (al 0.4%). Las líneas punteadas fueron horas en las cuales no se registro lectura.

A: SM-R1; B: SM-F4. Cepa silvestre 0.4% (—): 2.0% a 0.2% (+), 2.0% a 2.0% (□), 0.2% a 0.2% (•), 0.2% a 2.0% (x).

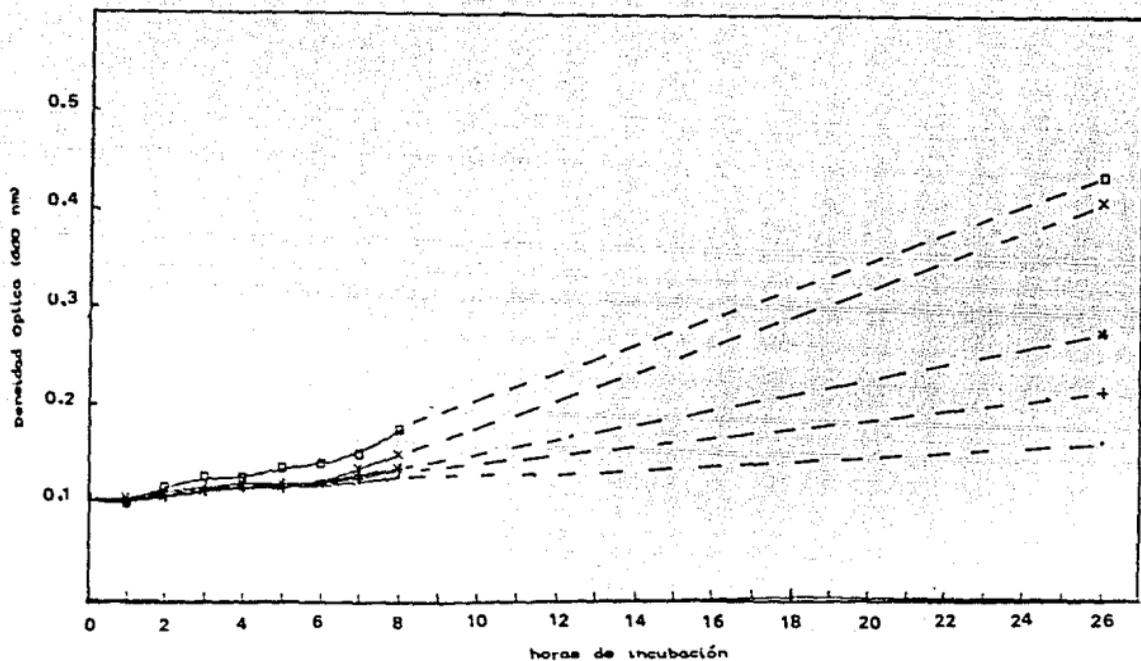


FIG. 8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA SA-5406 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE β -GLICEROLFOSFATO.

El inóculo se creció toda la noche en medio rico (30ml). Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron 2 veces con SSE y se pasaron a Davis N/10 con β -glicerolfosfato a diferentes concentraciones. Las líneas punteadas fueron tiempos en los cuales no se registro lectura. el último punto si se leyó. 0.2% (—+), 0.4% (—+), 0.6% (—+), 1.0% (—□), 2.0% (—+).

3.-Electroforesis unidimensional en placa.

Con el fin de observar si había inducción de algunas proteínas cuando las células eran crecidas en β -glicerolfosfato, se corrieron los tres tipos de cepas (β^- , β^+ lentas y β^+ rápidas) en geles de poliacrilamida al 12.5%; para lo cual se obtuvieron extractos totales de las cepas SA-540b, SM-F4 y SM-F41, tal como se indicó en el capítulo de materiales y métodos. Las cepas fueron cultivadas en medio rico, β -glicerolfosfato (0.4%) y con glicerol (0.4%) alrededor de 12 horas hasta llegar a una absorbancia aproximada de 0.6 unidades (a 660 nm). Las cepas SA-540b y SM-F4 (β^+ lentas) no alcanzaron ese valor de absorbancia en β -glicerolfosfato aún en 24 horas, por lo que se ajustó concentrando por centrifugación.

Los carriles se cargaron en el siguiente orden:

- 1) Marcadores de peso molecular (MPM)*
- 2) SM-F4 crecida en medio rico
- 3) SM-F4 " glicerol
- 4) SM-F4 " β -glicerolfosfato
- 5) SM-F41 " medio rico
- 6) SM-F41 " glicerol
- 7) SM-F41 " β -glicerolfosfato
- 8) SA-540b " medio rico
- 9) SA-540b " glicerol
- 10) SA-540b " β -glicerolfosfato

*MPM (miosina 205 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, albúmina bovina 45 kDa, albúmina de huevo 45 kDa y anhidrasa carbónica 29 kDa).

En la figura 9A vemos el gel tefido con azul de Coomassie. Con el fin de poder detectar más proteínas, se recurrió a una tinción más sensible como es la técnica de la doble tinción (azul de Coomassie y nitrato de plata), esto se observa en la figura 9B.

Primeramente, se observa que todas las cepas cambian la

expresión de sus proteínas en glicerol y en β -glicerolfosfato respecto a su crecimiento en medio rico.

Efectivamente con nitrato de plata se detectan mucho más bandas que con la tinción de azul de Coomassie sola, sin embargo, la tinción no fue uniforme, por lo que no todas las bandas resultan muy claras y es difícil hacer el análisis en este gel; pero dentro de lo que podemos notar es que se observa mayor cantidad de proteína en los carriles correspondientes al glicerol (carriles 3, 6 y 9).

Se observa una proteína de aproximadamente 93 kDa, cuyo patrón es el siguiente:

	rico	glicerol	β -glicerolfosfato
Cepa silvestre	+ (8)*	+ (9)	-
lenta	-	+ (3)	+ (4)
rápida	-	+ (6)	-

* en la tinción de Coomassie sólo se observa esta, en la doble tinción se observan las demás.

Esta proteína, podemos observar que se encuentra presente en glicerol para las tres cepas, sin embargo, en β -glicerolfosfato parecería ser que sólo la requiere la cepa lenta.

Por otra parte, encontramos 4 proteínas de inducción para glicerol (carriles 3, 6, 8 en la figura 9A), las cuales se encuentran también presentes en el cultivo de la cepa rápida en β -glicerolfosfato (carril 7); estas proteínas tienen aproximadamente 76, 70, 40 y 26 kDa de peso molecular.

FIG. 9. PATRON ELECTROFORETICO DE EXTRACTOS TOTALES DE LAS CEPAS SA-540b, SM-F4 Y SM-F41

Los inoculos se crecieron durante 8 horas en caldo rico. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con SSE y se pasaron a matraces con Davis N°10 con las fuentes de carbono que se mencionan (0.4%) y a medio rico, y se crecieron toda la noche.

A las 12 horas se ajustaron todos los matraces a 0.6 unidades de absorbancia con SSE. Se tomaron 3 ml. se cosecharon de ahí las células, se les agrego amortiguador de muestra y tris-HCl 0.0425M pH 8.3 mas inhibidores de proteasas y se continuo con el procedimiento descrito en el capítulo de materiales y métodos.

Se cargo el gel con aproximadamente 120 µg de proteína por carril, en el siguiente orden:

- 1) MPM
- 2) SM-F4 crecida en medio rico
- 3) " " en glicerol
- 4) " " en β-gol-P (*)
- 5) SM-F41 " en medio rico
- 6) " " en glicerol
- 7) " " en β-gol-P
- 8) SA-540b " en medio rico
- 9) " " en glicerol
- 10) " " en β-gol-P (*)

*Las celulas se mantuvieron 24 horas en β-glicerolfosfato porque el crecimiento es muy lento.

A: TINCION DE COOMASSIE

kDa

206

116

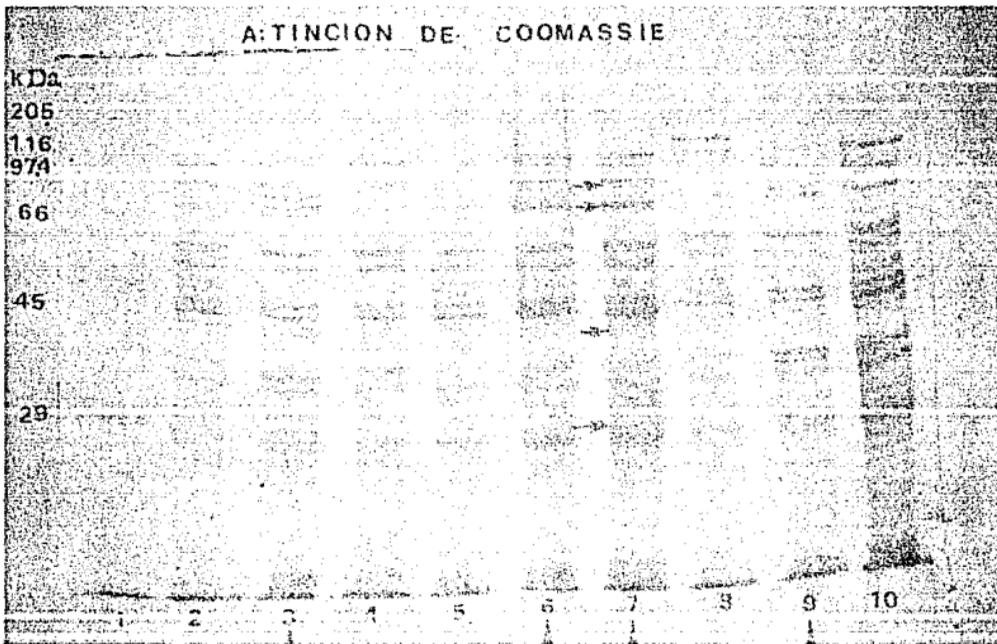
97.4

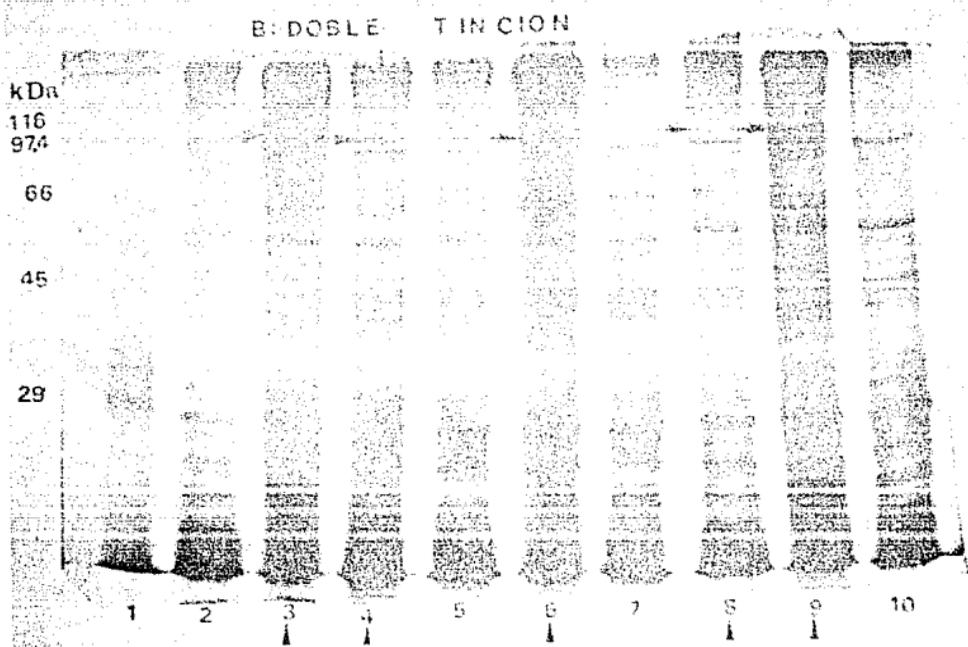
66

45

29

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10





VI. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos decir que la frecuencia de mutación espontánea en *Salmonella typhimurium* para la utilización lenta de β -glicerolfosfato es muy baja (4.24×10^{-12}), si tomamos en cuenta que en general las frecuencias de mutación por generación en bacterias es de 1×10^{-6} o menor, aunque bajo ciertas condiciones y con ciertos tipos de caracteres se pueden observar frecuencias mucho más altas. Además, las mutantes β^+ tardan muchos días en aparecer y utilizar francamente esta fuente de carbono. Simon y Silverman (1983) han presentado una lista parcial de caracteres bacterianos en donde se han reportado cambios genéticos rápidos; esta lista incluye antígenos de superficie, variación en la fase flagelar, morfología de la colonia, variación en la pigmentación, bioluminiscencia y sensibilidad a fagos. La más estudiada es la variación en la fase flagelar, que es debida a una región en el genoma que sufre inversión con una alta frecuencia, de 10^{-3} a 10^{-5} por generación celular (Brock, 1990).

Volviendo a la frecuencia para la utilización de β -glicerolfosfato, es posible aumentar en gran medida esta frecuencia hasta 1.76×10^{-6} con la ayuda de un agente mutagónico, como es la NG.

Se repitió varias veces la mutación y selección de mutantes β^+ (al 0.4%) obteniéndose de una sola mutación exclusivamente mutantes de tipo β^+ lento; siendo siempre necesaria una segunda mutación, inducida o espontánea, a partir de una mutante β^+ lenta para la obtención de una mutante β^+ rápida; esto ya había sido reportado por De la Garza (1981). Quizás, sea necesario modificar ciertas condiciones como la concentración de la fuente de carbono para poder obtener de una sola mutación mutantes β^+ rápidas.

Nos propusimos localizar la marca de utilización de β -glicerolfosfato buscando cepas auxótrofas que además fueran β^+ . Esto lo

hicimos agregando al medio extracto de levaduras o casaminoácidos en muy baja cantidad. En ambos tipos de mutación, tanto espontánea como inducida, hemos visto que al agregar al medio estos requerimientos se ve algo favorecido el crecimiento de las mutantes (se obtiene el doble de mutantes para extracto de levaduras y el triple para casaminoácidos); esto no podría ser porque las células de alguna forma esten utilizando estos compuestos como fuente de carbono y energía, ya que se encuentran en muy bajas concentraciones, además de que de ser así, crecerían todas y se vería un crecimiento homogéneo en la caja. No nos es posible, en base a nuestros experimentos saber a que se deba esto; lo que podríamos suponer es que quizás existan mutantes β^+ que son inestables y que de alguna forma se esten ayudando con el requerimiento. Por otro lado puede ser que sea mayor el crecimiento en casaminoácidos que en extracto de levaduras porque, aunque en este se encuentren más compuestos (vitaminas aminoácidos, pequeños péptidos y bases) que en casaminoácidos (aminoácidos y pequeños péptidos) quizás en la solución esten más disponibles a la bacteria los aminoácidos y los pequeños péptidos provenientes de casaminoácidos.

Utilizamos la NG como agente mutagénico ya que se conoce que puede provocar mutaciones vecinas con una alta frecuencia, suficiente para poder encontrar mutantes multi-auxótrofas (Eisenstark y col. 1965), y mayor que la reportada para mutación espontánea de dos marcas vecinas, la cual se encuentra en el orden 1×10^{-12} (Lewin, 1977); por lo que el uso de este agente alquilante nos permitiría obtener una mutante que fuera β^+ y que además tuviera alguna auxotrofia, lo cual nos sería útil para tener idea de donde pudiera encontrarse el gen responsable de la utilización de β -glicerolfosfato en *Salmonella typhimurium*. Ya en el laboratorio se ha utilizado este agente para obtener mutantes vecinas; por ejemplo R. Bautista (comunicación personal) obtuvo una mutante de *S. typhimurium* Kdp⁻Gal⁻ que una vez estudiada se concluyó que los genes

del sistema Kdp en *S. typhimurium* se encuentran muy cercanos al operon de galactosa situado en el minuto 18 (García Cuellar 1990). Posteriormente, R. Bautista confirmó la cercanía de ambos genes por experimentos de conjugación y de transducción.

A pesar de haberse realizado 14 mutaciones, y parchado 4333 colonias para la obtención de una mutante β^+ con alguna auxotrofia, no se obtuvo alguna con estas características. Obtener una mutante que además de ser β^+ , requiera de algo para su crecimiento es mucho más complicado que obtener una mutante β^- , por lo que se requieren mucho más mutaciones y parchar gran cantidad de colonias y, probablemente, utilizar la técnica de enriquecimiento con penicilina propuesto por Davis (1948) y por Lederberg y Zinder (1948) con la cual se enriquece enormemente el cultivo de mutantes auxotrofas.

Analizando las cinéticas de crecimiento que se presentan en este trabajo, podemos observar claramente que existen dos tipos de mutantes para la utilización de β -glicerolfosfato, las que lo utilizan lentamente y las de rápida utilización. Ya De la Garza (1981) describió la posible vía de utilización para las mutantes β^- lentas, que sería la misma que en *E. coli*, es decir, primero convirtiéndose a glicerol por acción de una fosfatasa y luego a L- α -glicerolfosfato por acción de una cinasa, siguiendo después la ruta normal del L- α -glicerolfosfato. Aunque ambas mutantes entran a la célula por el sistema de transporte del L- α -glicerolfosfato (De la Garza 1981), no se sabe cual es la vía de utilización que siguen las mutantes rápidas.

Comparando las cepas SM-R1 y SM-F4, ambas β^- lentas, también podemos observar que no tienen el mismo patrón de crecimiento siendo todavía mucho más lenta la cepa SM-F4. Esto nos lleva a pensar que también es diferente el tipo de comportamiento dependiendo de la cepa de la que provengan, quizás hay algún factor que este mediando la entrada del sustrato, o que regule cómo se va a

S. typhimurium tienen un nivel muy bajo de utilización de β -glicerolfosfato, aunque sólo se observa cuando se crecen en aerobiosis o bajo ciertas condiciones específicas.

Analizando los geles de electroforesis, podemos decir que todas las cepas cambian la expresión de sus proteínas en glicerol y en β -glicerolfosfato. Para la cepa rápida, podemos observar que se encuentran 4 proteínas de inducción en β -glicerolfosfato que tienen aproximadamente 76, 70, 40 y 26 kDa de peso molecular, sin embargo estas proteínas se encuentran presentes en las 3 cepas en glicerol, por lo que sabemos que son proteínas de inducción del glicerol y que de alguna manera también se expresan en β -glicerolfosfato sólo para la cepa rápida, o que en esta se encuentren en mayor concentración y en las otras no sea posible detectarlas. Aun utilizando la técnica de la doble tinción no nos fue posible encontrar alguna proteína que solamente se encontrara inducida en β -glicerolfosfato, para lograr esto sería necesario correr geles de dos dimensiones, ya que en una dimensión se llegan a observar bandas gruesas en las cuales podría haber varias proteínas juntas, de igual peso molecular.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo podemos concluir lo siguiente:

- 1.- La mutación para la utilización de β -glicerolfosfato por *Salmonella typhimurium* LT2 tiene una frecuencia espontánea de 4.24×10^{-12} ; induciendo la mutación con nitrosoguanidina se aumenta esta la frecuencia a 1.76×10^{-6} .
- 2.- Existen dos tipos de mutantes β^+ , las de lenta utilización y las que lo utilizan rápidamente. Sólo se han podido obtener de una sola mutación mutantes β^+ lentas (esto es utilizando el β -glicerolfosfato al 0.4%); es necesaria una segunda mutación espontánea o inducida a partir de estas mutantes lentas para poder obtener una mutante β^+ rápida.
- 3.- Aparentemente es muy fácil que se seleccionen mutantes rápidas a partir de mutantes β^+ por lo que se pierden en muchas ocasiones las mutantes lentas.
- 4.- Bajo nuestras condiciones experimentales, y con la cantidad de mutantes empleadas, no nos fue posible obtener un mutantes β^+ auxótrofas. Sin embargo, se pudo observar que se aumenta al doble el número de mutantes β^+ obtenidas al agregar al medio extracto de levaduras como requerimiento y, el triple si se utiliza caseína.
- 5.- Existe una presión selectiva del medio que puede observarse en las cinéticas de crecimiento al aumentar la concentración del β -glicerolfosfato, siendo favorecido el crecimiento de las mutantes β^+ lentas.

6.- Por electroforesis unidimensional no se encontró una proteína específica de inducción de β -glicerolfosfato. Sin embargo, se observaron 4 proteínas de inducción del glicerol que también se encuentran inducidas en β -glicerolfosfato para la cepa β^+ rápida y cuyos pesos moleculares son 76, 70, 40 y 26 kDa.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aceves-Pifa E., M.V. Ortega M. Artis. 1974. Linkage of the *Salmonella typhimurium* chromosomal loci encoding for the cytochrome linked L- α -glycerophosphate dehydrogenase and amylo maltose activities. *Arch. Microbiol.* 101:59-70
- Adelberg E., M. Mandel, G. Cheir Ching Chen. 1965. Optimal condition for mutagenesis by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. & Biophys. research. comm.* 18:788-795
- Argast M., D. Ludtke, T.H. Silhavy, W. Boos. 1978. A second transport system for sn-glycerol-3-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 136:1070-1083
- Argast M., W. Boos. 1979. Purification and properties of the sn-glycerol-3-phosphate binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254:10931-10935
- Ayala K. 1984. Genetica Moderna. Fondo Educativo Interamericano Barcelona, España. p. 584
- Bachmann B.J. 1983. Linkage map of *Escherichia coli* K12, Edition 7. *Microbiol. Rev.* 47:180-230
- Bolstein D., E.W. Jones. 1969. Nonrandom mutagenesis of the *Escherichia coli* genome by nitrosoguanidine. *J. Bacteriol.* 98:847-848
- Brock T. 1990. The Emergence of Bacterial Genetics. CSH (Centennial) Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. p. 50
- Cairns J., J. Overbaugh, S. Miller. 1988. The origin of mutants. *Nature.* 335:142-145

Carrillo C.G., M. Ortega. 1967. Effect of inorganic phosphatase activities: Non-repressible alkaline phosphatase and non-inhibited acid phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* 146:535-543

Cerda-Olmedo E., P.C. Hanawalt, 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

Cozarelli N.R., J.P. Koch, S. Hayashi, E.C.C. Lin. 1965. Growth stasis by accumulated L- α -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 90:1325-1329

Davis B.D. 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J. of the American Chemical Society.* 70:4267

De la Garza M. 1981. Estudios bioquímicos y genéticos sobre la utilización de β -glicerolfosfato por *Salmonella typhimurium* LT2. Tesis profesional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Mexico D.F. 152pp.

Echols H., A. Garer, A. Torriani. 1961. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 3:425-438

Eisenstak A., R. Eisenstark, R. Vansickle. 1965. Mutation of *Salmonella typhimurium* by nitrosoguanidine. *Mutation Research.* 2:1-10

Garcia-Cuellar C. 1990. Caracterización de una mutante de transporte de potasio en *Salmonella typhimurium* LT2. Tesis profesional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. México D.F. 67pp.

Graeme-Cook K.A., G. May, E. Bremer, L.F. Higgins. 1989. Osmotic regulation of porin expression; a role for DNA supercoiling. *Molec. Microbiol.* 3:1287-1294

Gutnick D., J.M. Calvo, T. Kloptowski, B.N. Ames. 1969. Compounds which serve as sole source of Carbon or Nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 100:215-219

Hageman G.D., S.L. Rosenberg. 1970. the evolution of bacterial enzyme systems. *Ann. Rev. Microbiol.* 24:429-462

Hall B.G. 1988. Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetics.* 120:887-897

Hall B.G. 1990. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics.* 126:5-16

Hall B.G. 1991. Increased rates of advantageous mutations in response to environmental challenges. *ASM News.* 57:82-86

Havashi S., E.C.C. Lin. 1965. Product induction of glycerol kinase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 14:515-521

Heppel L.A., R.W. Brockman. 1968. On the localization of alkaline phosphatase and cyclic phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 7:2554-2561

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685

Lederberg J., N.D. Zinder. 1948. Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J. of the American Chemical Society*. 70:4267-4268

Lederberg J., E.M. Lederberg. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399-406

Lewin B. 1977. Gene Expression 3. Jhon Wiley & Sons. New York. USA. p. 62

Lin E.C.C. 1976. Glycerol dissimilation in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:535-578

Lin E.C.C. 1987. Dissimilatory pathways for sugars, polyols and carboxylates p.224-284. In Neidhardt F. Salmonella typhimurium & Escherichia coli. American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.

Luria S.E., M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28:491-511

Moreno M.R., J.F. Smith, R.V. Smith. 1985. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie Blue-Silver stain procedure. *Analytical Biochem.* 151:466-470

Nakata A., G.R. Peterson, E.L. Brooks, F.G. Rothman. 1971. Localization and orientation of the *pho A* locus on the *Escherichia coli* K12 linkage map. *J. Bacteriol.* 107:683-689

Parada J., M.V. Ortega. 1967. Growth inhibition by hexoses of a temperature sensitive thiazoleless mutant of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 94:707-711

Sanderson K.E., J.R. Roth. 1988. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, edition VII. *Microbiol. Rev.* 52:485-532

Sanno Y., T.H. Wilson y E.C.C. Lin. 1968. Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 32:344-347

Simon M.I., M. Silverman. 1983. Recombinational regulation of gene expression in bacteria. pp. 21-227. In Beckwith J., J. Davies, J.A. Gallant (ed). Gene Function in Prokaryotes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Yagil E., M. Bracha, Y. Lifshitz. 1975. Regulatory nature of *pho B* gene for alkaline phosphatase synthesis of *Escherichia coli*. *Mol. Genetics.* 137:11-16

utilizar. Sin embargo con los estudios que realizamos no lo podemos saber.

Por otro lado, ambos tipos de mutantes no presentan ninguna modificación en su cinética de crecimiento en glicerol, con respecto a la cepa silvestre.

Se ha visto que una vez obtenida una mutante β^* lenta, aparentemente es muy fácil obtener una β^* rápida; al estar reseleccionando las mutantes β^* lentas en β -glicerolfosfato hemos encontrado que aparecen de pronto mutantes β^* rápidas. En base a esto y a los resultados observados, sobre todo en la cepa SM-F4 crecida a diferentes concentraciones de β -glicerolfosfato, podemos pensar que existe una fuerte presión selectiva del medio que está ayudando a nuestras mutantes lentas a volverse rápidas. Aunque existe desde los años 1920s una fuerte discusión si la mutación y la selección son eventos independientes, de acuerdo a los experimentos descritos por Cairns y colaboradores (1988) y por Hall (1988, 1990 y 1991) en los que nos muestran varios casos en los cuales existe una presión selectiva del medio para favorecer ciertas mutaciones, nosotros estamos casi convencidos que en nuestras mutantes está ocurriendo lo mismo; esto sólo es posible observarlo en las mutantes lentas, donde la presión selectiva fue más clara, pues en las rápidas su crecimiento fue muy bueno desde un inicio. Para complementar nuestros estudios de la participación del medio de cultivo en la obtención de un mayor número de mutantes, sería necesario realizar varios experimentos, por ejemplo modificando las concentraciones de la fuente de carbono en estudio y trabajando con un número mayor de mutantes.

La cepa SA-540 no crece en β -glicerolfosfato, sin embargo, una clona que se tomó creció solamente en medio líquido (aerobiosis) y muy lentamente, de manera muy similar a la cepa SM-F4; se probó varias veces en microaerobiosis (medio sólido) y no se observó crecimiento. Probablemente algunas cepas silvestres de