



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
I Z T A C A L A
LICENCIATURA DE BIOLOGIA

**Localización del Gen Involucrado en la Utilización del
L - Aspartato como Unica Fuente de Carbono en
Mutantes de *Salmonella typhimurium* LT-2.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
SILVIA TENORIO SALGADO

Directora de Tesis:
DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

Los Reyes Iztacala, Estado de Méx.

1994



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.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Carmela Salgado y Rogelio Tenorio. Las dos personas que más me han alentado para seguir adelante en cualquier empresa que quiera realizar. Gracias.

A mis hermanos, por haberme soportado todo este tiempo y el que falta.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO:

A la Dra. Mireya de la Garza por su gran ayuda para la realización de este trabajo y por su amistad.

A mis mejores amigas: Renata y Tere.

A mis compañeros de laboratorio: Magda, Lilian, Jesús, Erasmo, Claudia, Victor, Delfino y Esteban.

A Alma Delia por haberme ayudado con las graficas.

A todas las personas que intervinieron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las cepas silvestres de *Salmonella typhimurium* LT-2, SA534 y SA536 están formadas por poblaciones heterogéneas, cuando se crecen en L-aspartato como única fuente de carbono, es decir poseen clonas que no utilizan este compuesto como fuente de carbono y clonas que lo utilizan lentamente. Esto se observó al aumentar la concentración de L-aspartato a más del doble. La cepa SA955 no presentó este fenómeno ya que esta formada por una población homogénea.

Se obtuvieron mutantes inducidas con NTG, de las diferentes cepas, con la capacidad de crecer en L-aspartato en bajas concentraciones y también se obtuvo una mutante espontánea capaz de crecer en este aminoácido en altas concentraciones, pero lentamente.

Se logró caracterizar bioquímicamente a los sistemas de transporte de L-aspartato modificados en las mutantes obtenidas, tanto la espontánea como las inducidas, encontrando 2 tipos de cepas. 1) Mutantes que sobreexpresaron un sistema de transporte para L-aspartato compartido con L-glutamato, sensible a D-glutamato, 2) Mutantes que sobreexpresaron un sistema de transporte inducible exclusivo para L-aspartato sensible a D-aspartato y a D-L-treo- β -hidroxiaspartato. Este último se mapeo genéticamente, encontrándose en el minuto 7.5 del cromosoma bacteriano.

INDICE

| | |
|--|------------|
| RESUMEN | <i>iii</i> |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. OBJETIVOS | 7 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 8 |
| 1. CEPAS BACTERIANAS | 8 |
| 2. MEDIOS DE CULTIVO | 8 |
| 3. CONDICIONES DE CULTIVO | 9 |
| 4. CLONACION | 9 |
| 5. OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS E INDUCIDAS PARA LA UTILIZACION DE L-ASPARTATO | 10 |
| 6. OBTENCION DE MUTANTES PARA LA UTILIZACION DE L-ASPARTATO CON MARCA DE AUXOTROFIA | 11 |
| 7. OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A ESTREPTOMICINA | 12 |
| 8. COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, EN FUNCION DE SU CONCENTRACION | 11 |
| A) EN MEDIO SOLIDO | 11 |
| B) EN MEDIO LIQUIDO | 12 |
| 9. INFLUENCIA DEL SODIO EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO | 12 |
| A) EN MEDIO SOLIDO | 12 |
| B) EN MEDIO LIQUIDO | 13 |

| | |
|---|----|
| 10. IDENTIFICACION DE REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES | 13 |
| 11. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANALOGOS TOXICOS DE L-ASPARTATO | 14 |
| 12. LOCALIZACION DEL GEN POR CONJUGACION INTERRUMPIDA | 14 |
| 13. TRANSPORTE | 15 |
| 14. COMPETENCIA POR EL TRANSPORTE DE L-ASPARTATO MARCADO RADIOACTIVAMENTE | 16 |
| IV. RESULTADOS | 17 |
| 1.1 COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE L-ASPARTATO | 17 |
| 1.2 CLONACION DE LAS CEPAS | 18 |
| 1.3 OBTENCION DE MUTANTES | 19 |
| 1.4 CINETICAS DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO | 21 |
| 1.5 ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE TRASPORTE MEDIANTE LA SENSIBILIDAD A ANALOGOS TOXICOS | 22 |
| 1.6 LOCALIZACION GENETICA | 23 |
| 1.7 TRANSPORTE DE L-ASPARTATO MARCADO RADIOACTIVAMENTE | 23 |
| 1.8 COMPETENCIA POR EL TRANSPORTE | 24 |
| V. DISCUSION | 26 |
| VI CONCLUSIONES | 31 |
| VII BIBLIOGRAFIA | 32 |

INTRODUCCION

Salmonella typhimurium LT-2, al igual que *Escherichia coli*, es capaz de crecer en un medio mínimo que contenga una variedad amplia de compuestos orgánicos como fuente de carbono, y por tanto como fuente de energía, y una limitada variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de nitrógeno (Magasanik y Neidhart, 1987). Entre la amplia gama de compuestos orgánicos que *S. typhimurium* puede utilizar como única fuente de carbono y energía, se encuentran algunos azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, amidas, ésteres, éteres, anillos aromáticos y aminoácidos. Los únicos aminoácidos que *S. typhimurium* puede consumir como fuente de carbono son L-alanina, L-histidina y L-prolina, aunque por lo general utiliza como fuente de nitrógeno todos los aminoácidos (Gutnik et al, 1969). Al igual que *E. coli*, *S. typhimurium* es incapaz de crecer en L-glutamato o L-aspartato como únicas fuentes de carbono y energía, a pesar de que ellas poseen la ruta metabólica para ambos aminoácidos (Alvarez et al, 1986; Gutnik et al 1969; Halpern et al, 1965; Vender et al, 1965).

Se han comunicado varios trabajos sobre el metabolismo y transporte de ambos aminoácidos. En el caso de glutamato, al encontrarse en el interior de la célula bacteriana sufre una transaminación con el oxalacetato y forman α -cetoglutarato y

aspartato. El aspartato es desaminado por la aspartasa, una enzima sumamente específica. Esta enzima toma el grupo amino del aspartato y produce amonio y fumarato. Este último entra directamente al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en donde se degrada para producir energía (Figura 1) (Vender et al, 1965; Bender, 1975; Alvarez et al; 1986).

Como se puede observar, el metabolismo no es el impedimento por el cual *E. coli* y *S. typhimurium* sean incapaces de utilizar el L-glutamato o el L-aspartato como únicas fuentes de carbono, sino que el transporte es la barrera que impide que estas bacterias puedan consumir estos aminoácidos (Halpern et al, 1961; Marcus et al, 1969). Se han realizado una serie de estudios que indican que la cepa silvestre de *E. coli* no puede utilizar L-glutamato ni L-aspartato como únicas fuentes de carbono, presenta bajos niveles de permeasa, ésto debido a que en esta cepa la síntesis de la permeasa se encuentra reprimida; sin embargo, las mutantes capaces de crecer en estos aminoácidos poseen niveles elevados de la permeasa, además de que el sistema de transporte se vuelve constitutivo (Halpern et al, 1965; Marcus et al, 1967). Por otra parte, se ha visto que células completas de *E. coli*, cepa silvestre, reducen lentamente el colorante cloruro de trifeniltetrazolium en presencia de L-glutamato, mientras que extractos celulares de la misma cepa lo reducen rápidamente, al igual que las células completas y sus respectivos extractos de mutantes de *E. coli* capaces de utilizar L-glutamato como fuente

de carbono (Halpern, et al, 1960). Esto indica que en la cepa silvestre la entrada del aminoácido es muy lenta y en las mutantes se da este fenómeno rápidamente debido a que la permeabilidad es el impedimento por el cual la célula no puede utilizar el L-glutamato como fuente de carbono y energía.

Se han localizado genéticamente varios sistemas de transporte para L-glutamato. El primero fue descrito en *E. coli*. Este sistema de transporte es exclusivo para L-glutamato, es dependiente de sodio y presenta sensibilidad a D-glutamato y a α -metilglutamato. Está codificado por el operón *gltC-gltS* que se localiza en el minuto 80 del cromosoma bacteriano, en donde *gltS* es el gen estructural que codifica para la proteína transportadora del L-glutamato y *gltC* es el sitio operador. Este operón está regulado por el gen *gltR* que se localiza en el minuto 92 del cromosoma (Marcus, et al, 1967). Este sistema también se encontró en *S. typhimurium*, con la misma localización genética pero diferentes características bioquímicas; al igual que en *E. coli*, *gltS* es el gen estructural, *gltC* el sitio operador y *gltR* el gen regulador. Este sistema no transporta exclusivamente L-glutamato, como sucede en *E. coli*, también transporta L-aspartato y es sensible a D-L-treo- β -hidroxiaspartato y a cisteato (Tabla I) (Alvarez et al, 1986).

En *E. coli* se ha encontrado otro sistema más, compartido por ambos aminoácidos, el cual es altamente sensible a D-L-treo- β -

hidroxiaspartato y a cisteato, localizado en el minuto 92.5 del cromosoma bacteriano; al gen que lo codifica lo denominaron *gltP*. Este sistema se encuentra en mutantes y su expresión esta aumentada (Boot et al, 1989).

En lo que respecta a *S. typhimurium*, se ha localizado otro sistema de transporte exclusivo para L-glutamato, el cual es sensible a α -metilglutamato e independiente de sodio; el gen que lo codifica se encuentra en el minuto cero del cromosoma bacteriano y se denomina *gltF* (Alvarez et al, 1986) (Tabla I).

En *E. coli*, en total se han caracterizado bioquímicamente cinco sistemas de transporte para L-aspartato y L-glutamato como fuentes de nitrógeno, de los cuales algunos son compartidos por ambos aminoácidos, otros son exclusivos y otros son compartidos con otros compuestos (Figura 2). Los cinco sistemas son: 1) Sistema de transporte para L-aspartato, independiente de proteína de unión, con una Km de 30 μ M, inhibido por D-aspartato y D-L-treo- β -hidroxiaspartato y transporta el 23% del total de L-aspartato. Este sistema de transporte se conocía anteriormente con el nombre de *ast* y hasta el momento sólo se ha caracterizado en *E. coli* (Kay, 1971). 2) Sistema independiente de proteína de unión, transporta ambos aminoácidos, es independiente de sodio y es inhibido por D-L-treo- β -hidroxiaspartato; este sistema de transporte se encarga del 60% del transporte de L-glutamato y del 52% del transporte de L-aspartato y posee una Km de 5 μ M para L-glutamato y de 4 μ M para L-

aspartato. 3) Sistema de transporte específico para L-glutamato, independiente de proteína de unión y dependiente de sodio, sensible a D-glutamato, α -metilglutamato y homocisteato, con una Km de 1.5 μ M, se encarga del 25% del transporte total de L-glutamato. Este sistema es el codificado por el operón mencionado anteriormente *gltS-gltC* del minuto 80, que se ha encontrado en ambas especies. 4) Sistema de transporte dependiente de proteína de unión e independiente de sodio, transporta L-aspartato y L-glutamato, es inhibido por cisteato, posee una Km de 0.5 μ M para L-aspartato y 0.5 μ M para L-glutamato. Este sistema se encarga del 15% del transporte total de L-glutamato y del 25% del transporte total de L-aspartato. En *S. typhimurium* también se ha encontrado esta proteína de unión con idénticas características a la de *E. coli*. (Aksamit et al, 1975). 5) Sistema de transporte para L-aspartato, compartido con fumarato, malato y succinato, es inhibido por D-aspartato en altas concentraciones y ninguno de los análogos de ácidos dicarboxílicos inhibe el transporte. Este sistema se encuentra en ambas especies y está determinado por los genes *dct*, que se localizan en los minutos 16 y 80, para *E. coli* y en el minuto 77 para *S. typhimurium* (Bachman, 1987; Parada et al, 1973; Sanderson et al, 1987). No se ha podido evaluar el porcentaje del transporte para L-aspartato a través de este sistema, ya que es un valor sumamente pequeño (Shelleberg et al, 1977.).

Además de la caracterización bioquímica de los sistemas de transporte para L-aspartato y L-glutamato, se han realizado

estudios sobre la influencia de la concentración de L-glutamato como fuente de carbono y la influencia de la presencia del sodio. En estos estudios se muestra que *E. coli* (cepa silvestre) no utiliza L-glutamato en bajas concentraciones (20 mM), sólo cuando se le adiciona sodio, 3 mM, 5 mM y 10 mM, pero al elevar demasiado la concentración del L-glutamato, cinco veces, no hay necesidad de adicionar sodio, ya que el aumento de concentración favorece la utilización de este aminoácido como única fuente de carbono, en esta cepa (Frank y Hopkins, 1969).

Como se puede observar, L-aspartato y L-glutamato comparten algunos sistemas de transporte. Sin embargo, en *E. coli* y en *S. typhimurium* no se han reportado mutantes capaces de utilizar L- o D-aspartato como única fuente de carbono y energía. Por ello, en el laboratorio nos propusimos obtener mutantes de *S. typhimurium* LT-2 capaces de utilizar L-aspartato eficazmente, tanto en espontáneas, como en inducidas con nitrosoguanidina (NTG) y hacer una caracterización de estas mutantes respecto a su transporte.

OBJETIVOS

- 1) Estudiar el comportamiento de las cepas silvestres de *Salmonella typhimurium* LT-2, SA534, SA536 y SA955, en diferentes concentraciones de L-aspartato y la influencia del sodio en su crecimiento. Esto se hace debido a que en estudios preliminares se encontraron mutantes espontáneas de utilización lenta.
- 2) Clonación de todas las cepas, para iniciar cultivos negativos en la utilización de L-aspartato (AspU-).
- 3) Obtener mutantes Capaces de utilizar L.aspartato (AspU+) y mutantes que, además de ser AspU+, tengan alguna marca de auxotrofia.
- 4) Localizar en el cromosoma bacteriano el o los genes involucrados en el transporte de L-aspartato.
- 5) Estudiar los sistemas de transporte, con L-aspartato marcado radioactivamente, en mutantes AspU+, espontáneas e inducidas.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS

Para la realización de este trabajo se emplearon diversas cepas bacterianas derivadas de *Salmonella typhimurium* LT-2 (Tabla II).

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

Medio mínimo con glicerol (MM Gol), medio mínimo con aspartato (MM Asp), medio mínimo con glucosa (MM Glu), medio mínimo con glutamato (MM Glt) y medio rico (MR).

Todos los medios mínimos contenían una solución de sales con una concentración final de : fosfato de potasio monobásico al 0.3%, fosfato de potasio dibásico al 0.7%, sulfato de amonio al 0.1% y sulfato de magnesio al 0.01% (Davis 1x). Este es el medio de Davis y Mingioli sin citrato (1950). Todas las fuentes de carbono se esterilizaron por separado y se adicionaron al 0.4%. El L-aspartato y el L-glutamato además se adicionaron al 1% y 2%, para probar el

efecto de concentración en el crecimiento.

En el caso del medio rico se adicionó una solución de peptona de caseína al 0.2% y extracto de levaduras al 0.2%.

El pH de los medios se ajustó a 7.4 en un potenciómetro marca Corning modelo 125, empleando soluciones de NaOH y HCl, según fuera el caso.

CONDICIONES DE CULTIVO

Todas las cepas se crecieron a una temperatura de 37° C. El tiempo se especifica en cada experimento. Cuando los cultivos eran líquidos se utilizó una agitadora New Brunswick, N.J. modelo 6-25.

CLONACION

Las bacterias se crecieron toda la noche en MM Gol. Al día siguiente se reinoculó en el mismo medio y se incubó hasta fase logarítmica, 0.3 de absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. Posteriormente se centrifugó el cultivo y se lavó la pastilla con solución salina estéril al 0.9% (SSE), para después resuspenderla en SSE. Se hicieron diluciones en SSE, y se sembraron muestras de 100 µl en placas de MM Asp, al 0.4%, 1% y 2%, para observar el comportamiento de las cepas en las diferentes concentraciones de la fuente de carbono. Las placas se dejaron incubando durante 7 días.

OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS E INDUCIDAS PARA LA UTILIZACION DE L-ASPARTATO.

Para obtener las mutantes espontáneas se hizo un precultivo de la cepa silvestre toda la noche en MM Gol, al día siguiente se reinoculó en el mismo medio y se incubó hasta que alcanzó la fase logarítmica. Posteriormente se cosecharon las células mediante centrifugación y se lavaron con SSE; el paquete celular se resuspendió en SSE y se hicieron diluciones para tomar muestras y sembrarlas en MM Asp. En el caso de las mutantes inducidas se colocaron cristales de NTG en el centro de la caja. Las placas tanto de mutantes espontáneas como inducidas se incubaron hasta que aparecieron las mutantes. Cuando aparecieron éstas, tanto espontáneas como inducidas, se tomaron con palillo estéril y se pasaron al mismo medio de cultivo y posteriormente se probaron en diferentes medios de cultivo con L-aspartato , L-glutamato 0.4%, mediante la técnica de réplica en placa con terciopelo (Ledeberg y Ledeberg, 1952)

OBTENCION DE MUTANTES PARA LA UTILIZACION DE L-ASPARTATO CON MARCA DE AUXOTROFIA.

Se siguió el mismo método que se empleó en la obtención de mutantes para la utilización de L-aspartato, pero al medio se le

adicionó además extracto de levaduras (EL) al 0.05%. Para seleccionarlas se siguió la misma técnica que se empleó en la obtención de mutantes espontáneas e inducidas para la utilización de L-aspartato.

OBTENCION DE MUTANTES ESPONTANEAS RESISTENTES A ESTREPTOMICINA

Para obtener las mutantes resistentes a estreptomicina, se hizo un precultivo en MR, posteriormente se tomaron muestras y se sembraron en placas de MR con estreptomicina a diferentes concentraciones , 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron hasta que aparecieron las mutantes.

COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO.

A) MEDIO SOLIDO

Las bacterias se preincubaron en MM Gol. Posteriormente se cosecharon, se lavaron y se hicieron diluciones para sembrar por espatulado en medio mínimo con L-aspartato y en medio mínimo con L-glutamato en tres concentraciones diferentes, 0.4%, 1% y 2%. Las placas se revisaron cada 24 horas y se contaba el número de colonias grandes y pequeñas que aparecían, además de medir el tamaño de ellas.

B) MEDIO LIQUIDO

Las bacterias se preincubaron en MM Gol. Posteriormente se cosecharon, se lavaron y se inocularon a una $D.O_{(660nm)}$ de 0.09 en matraces nefelométricos con L-aspartato y L-glutamato como únicas fuentes de carbono en las tres concentraciones, 0.4%, 1% y 2%.

Posteriormente se midió la densidad óptica de los cultivos a 660nm, cada hora, en un espectrofotómetro Coleman Jr. modelo 6|20.

INFLUENCIA DEL SODIO EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO.

A) MEDIO SOLIDO

Se hizo un precultivo de toda la noche en MM Gol y al día siguiente se reinoculó en el mismo medio y se dejó hasta que llegó a fase logarítmica. Se obtuvieron las células por centrifugación y se hicieron diluciones en SSE, se sembraron por espatulado muestras de 100 μ l en placas de MM Asp al 0.4% con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio, 3 mM, 5 mM y 10 mM, comprobando siempre que el pH fuera de 7.4. Los resultados se revisaron cada 24 horas durante 7 días.

B) MEDIO LIQUIDO

Se hizo un precultivo de toda la noche en MM Gol, posteriormente se reinoculó a una $D.O_{(660)}$ de 0.09 en matraces nefelométricos MM Asp al 0.4% con diferentes concentraciones de sodio, 3mM, 5 mM y 10 mM, ajustando el pH a 7.4. Se midió densidad óptica a 660 nm durante 10 horas.

IDENTIFICACION DE REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Se sembraron las cepas SM-E3 y SM536-I21 dos veces en MM Gol y al tercer pase se inocularon matraces con MM Gol como única fuente de carbono, los cuales contenían combinaciones diferentes de aminoácidos. Las mezclas se numeraron del 1 al 9, con lo cual si creció en el número 1 y en el número 8, el requerimiento era fenilalanina, por ejemplo. Todos los aminoácidos se adicionaron a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

MEZCLA DE AMINOACIDOS.

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----|---------------|-----------|------------|---------------|----------|
| 6 | adenosina | guanosina | cisteina | metionina | tiamina |
| 7 | histidina | leucina | isoleucina | valina | lisina |
| 8 | fenilalanina | tirosina | triptofano | treonina | prolina |
| 9 | ac. glutámico | serina | alanina | ac. aspártico | arginina |

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANALOGOS TOXICOS DEL L-ASPARTATO

Las mutantes se sembraron en placas de agar de MM Asp y se incubaron hasta que hubiera un buen crecimiento; la cepa silvestre se sembró en placas de MR. De estos cultivos se llevó a DO de 1.5 a 660 nm en SSE (5ml), posteriormente se sembraron en placas de L-aspartato al 1%, por estría, para después colocar en el centro de la estría un círculo de papel filtro impregnado con cualesquiera de los siguientes análogos: D-L-treo- β -hidroxiaspartato, α -metilglutamato, β -metilaspartato, D-aspartato, D-glutamato, cisteato, homocisteato y tartrato de sodio. Todos los análogos se utilizaron al 2%, sólo el D-L-treo- β -hidroxiaspartato se manejó al 0.12%. Los resultados se revisaron a las 24 y 48 horas.

LOCALIZACION DEL GEN POR CONJUGACION INTERRUMPIDA

Se preparó un cultivo de toda la noche en MM Gol al 0.1% suplementado con EL al 0.05%, de la cepa donadora y la receptora, por separado, Al día siguiente se reinoculó en el mismo medio y se dejó crecer a 70% transmitancia. Posteriormente se colocaron a la donadora y la receptora juntas en MM Gol+EL en una proporción 5:1 (receptora y donadora, respectivamente), se filtraron con membrana millipore muy lentamente y la membrana se incubó en una caja de MM Gol+EL, a 37° C durante 5 minutos. Posteriormente la membrana se pasó a un matraz de boca ancha con MM Gol+EL y se incubó con una

agitación muy suave en un baño metabólico marca Lab-Line. Se tomaron muestras cada 5 minutos durante 2 horas, se diluyeron con SSE fría, se agitaron por un minuto en vortex para separar los pares de conjugación y se sembraron en MM Asp al 0.4% con estreptomicina, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados se revisaron a los 4 días y se contó el número de transconjugantes que se encontraban en cada tiempo.

TRANSPORTE

Las bacterias se inocularon en MM Asp al 0.4% y se incubaron toda la noche. Se cosecharon y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, se llevaron a DO de 1.4 a 660 nm en una mezcla de cloranfenicol y Davis 1X.

Se preparó el sustrato radioactivo de la siguiente manera:

5 μl de ^{14}C -L-aspartato (50 $\mu\text{Ci}/50 \mu\text{l}$) + 955 μl de L-aspartato al 30 mM

para tener una concentración final de sustrato en la mezcla con las células de 3mM.

Para hacer el ensayo por duplicado se tomó una muestra de 1.8ml de las células con DO 1.4 y 0.2 ml de la mezcla anterior. Se agitó constantemente y se mantuvo a 37° y se tomaron muestras de 100 μl a cada tiempo del ensayo (30", 60", 120", 180", 300" y 600"). Las

muestras se centrifugaron durante 15" en una microfuga marca Sargent-Welch modelo S-16114 en tubos eppendorff de 400 μ l con un colchón de 100 μ l de dibutilftalato, para que al centrifugar se separara la pastilla de la muestra radioactiva. Se cortó el fondo del tubo diagonalmente y se colocó el contenido en viales, se usó un contador de centelleo marca Beckman modelo LS6000SC.

COMPETENCIA POR EL TRANSPORTE DE L-ASPARTATO MARCADO RADIOATIVAMENTE

Se siguió la misma metodología que se utilizó en el transporte del L-aspartato marcado, pero al adicionarle la mezcla radioactiva se le agregó el análogo. Los análogos utilizados fueron: L-aspartato, D-aspartato, L-glutamato, D-glutamato, D-L-treo- β -hidroxiaspartato, α -metilglutamato, tartrato de sodio, β -metilaspartato y homocisteato. Los análogos se usaron 10 veces más concentrados que la fuente de carbono radiactiva.

RESULTADOS

COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA FUENTE DE CARBONO.

Al crecer las cepas LT-2, SA534 y SA536 en L-aspartato como única fuente de carbono a diferentes concentraciones, se observó lo siguiente:

i) En 0.4% la población en general no consumió el L-aspartato aunque hubo un crecimiento de fondo, que no se igualó al de franca utilización. Este resultado fue similar para las tres cepas.

ii) El índice de mutación espontánea, en 7 días de incubación, fue de 3.5×10^{-7} , 1×10^{-8} y 4.5×10^{-8} , para LT-2, SA534 y SA536, respectivamente.

Se observaron en todos los casos dos tipos de colonias: grandes, que medían por lo general de 2 a 3 mm y pequeñas, menores de 0.75 mm.

iii) En 1% y 2% se diferenció la población en dos tipos de colonias: medianas (0.75-1.5 mm) que utilizaron muy lentamente el

L-aspartato y que después de varios días de incubación no crecían más y muy grandes (3-5 mm) que lo utilizaron, aunque lentamente (48 a 72 horas). Además se pudo observar que la población en general aumentó de tamaño al aumentar la concentración de la fuente de carbono, y también aumentó la frecuencia de mutación espontánea (Tabla III).

Por otro lado, la cepa SA955 no presentó esa variabilidad poblacional en las diferentes concentraciones de L-aspartato, sino que tuvo una población homogénea, es decir, sus clones presentaron el mismo tamaño (menores de 0.75 mm) en todas las concentraciones de L-aspartato y su índice de mutación espontánea no presentó variaciones significativas (Tabla III).

Cuando se crecieron las cuatro cepas en L-aspartato sólido al 0.4%, como única fuente de carbono en presencia de sodio, no se presentó ningún cambio en el crecimiento por influencia de este ión.

CLONACION DE LAS CEPAS

Para poder iniciar de cultivos negativos para la utilización de L-aspartato, se clonaron las cepas que presentaron efecto de concentración y una población heterogénea. Se sembraron todas ellas en L-aspartato al 2% como única fuente de carbono, de ahí se aislaron clones que no presentaron un franco crecimiento en un

periodo de 7 a 8 días de incubación. De aquí se obtuvieron clonas pequeñas, negativas en L-aspartato. Además se obtuvo la clona SM-E3, una mutante espontánea de la cepa LT-2 con la capacidad de utilizar L-aspartato como única fuente de carbono y energía, pero lentamente (48 horas) (Tabla IV).

Sin embargo se encontró que las clonas pequeñas a su vez presentaron variabilidad en su tamaño poblacional, ya que a partir de éstas también se obtuvieron clonas pequeñas y grandes. También se encontraron clonas pequeñas muy estables, como es el caso de la SM-1P, SM534P y SM536P en las cuales no se obtuvo alguna clona grande en altas concentraciones de la fuente de carbono.

En este caso no se observó algún cambio en el crecimiento de la cepa silvestre clonada, en presencia o ausencia del sodio.

OBTENCION DE MUTANTES

El primer tipo de mutantes que se intentó obtener fue AspU+ con alguna marca de auxotrofia, derivadas de la cepa SM-1P. Se aislaron 10,315 probables auxótrofas en diferentes experimentos, pero no se logró obtener alguna mutante de este tipo, aunque todas poseían la capacidad de utilizar el L-aspartato lenta o rápidamente.

Al no obtener la mutante con auxotrofia, se decidió buscar mutantes con una sola característica, AspU+, derivadas de diversas cepas de *S. typhimurium*, todas por mutación inducida con NTG.

En el caso de la SM534-1P, se lograron aislar 225 colonias que podían utilizar el aspartato como única fuente de carbono y energía. De estas mutantes sólo 12 crecieron en 24 horas, de las cuales sólo 4 alcanzaban la fase logarítmica en 8 horas.

De la cepa SM536-P, se aislaron 150 probables mutantes y de éstas se obtuvieron sólo 7 clonas que crecieron en 24 horas, de las cuales dos alcanzaron la fase logarítmica en 7 horas.

Con respecto a la cepa SM955-P, se aislaron 150 mutantes y de éstas sólo dos crecieron en 24 horas y alcanzaban la fase logarítmica en 7 horas.

Los resultados anteriores se muestran en la tabla V

De las mutantes obtenidas de todas las cepas, sólo se utilizaron 5 en este trabajo: SM534-I31, SM536-I21, SM955-I5 y la SM955-I30 y como testigo la cepa SM-1P. De todas ellas primeramente se estudió su comportamiento en diferentes fuentes de carbono.

CINETICAS DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

La cepa testigo SM-1P presentó un crecimiento normal en glicerol y en glucosa, alcanzando la fase logarítmica en 5 y 3 horas, respectivamente. En el caso de L-aspartato y L-glutamato, esta cepa no puede utilizarlos como única fuente de carbono. (Figura 3.)

La cepa SM-E3, espontánea de crecimiento lento, mostró un comportamiento normal en glucosa y un crecimiento nulo en glicerol, cuando se pasaba por tercera vez en esta fuente de carbono. Además esta cepa puede utilizar L-aspartato y L-glutamato, en altas concentraciones aunque lentamente, ya que a las 24 horas de incubación alcanzó una DO de 0.24 para L-glutamato y de 0.45 para L-aspartato (Figura 4.).

La cepa SM534-I31 inducida no se afectó en la utilización de glucosa ni de glicerol, pero esta mutante sí creció rápidamente en L-aspartato, aunque no en L-glutamato (Figura 5).

Con respecto a la cepa SM536-I21, inducida, se puede observar que utilizó normalmente la glucosa como fuente de carbono, pero se afectó la utilización de glicerol, al igual que la SM-E3, además posee la capacidad de utilizar ambos, L-glutamato y L-aspartato como únicas fuentes de carbono. (Figura 6).

Con respecto a las cepas inducidas SM955-I5 y SMA955-I30, se observó el mismo comportamiento para ambas, ya que utilizaron glicerol y glucosa normalmente, y sólo presentaron la capacidad de consumir L-aspartato. (Figuras 7 y 8).

Al observar que las cepas SM-E3 y SM536-I21, presentaban problemas al crecerlas subsecuentemente en glicerol como única fuente de carbono, aunque hasta el tercer pase, se decidió ver si eran auxótrofas, encontrando que la cisteína es el requerimiento que ambas necesitan.

CARACTERIZACION DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE MEDIANTE LA SENSIBILIDAD A ANALOGOS TOXICOS.

Al tratar de caracterizar cuál sistema de transporte era el que las mutantes estaban expresando, se obtuvieron dos grupos. El primero está formado por las cepas SM536-I21 y SM-E3, las cuales fueron sensibles a D-glutamato. El segundo está formado por las cepas SM534-I31, SM955-I5 y SM955-I30, que compartieron sensibilidad al D-aspartato. La cepa SM-1P no presentó crecimiento en L-aspartato como única fuente de carbono, lo cual se indica con un signo negativo. A pesar de tener dos grupos bien definidos, se observó que todas presentaron sensibilidad al tartrato de sodio (Tabla VI).

LOCALIZACION GENETICA.

Se eligió como donadora la cepa SM534-I31, para hacer conjugación con una receptora resistente a 300µg/ml de estreptomicina (SM-E1P). El gen de utilización de L-aspartato como única fuente de carbono se localizó en el minuto 7.5 del mapa genético (Fig. 9). Esto se corroboró al hacer la conjugación con la cepa Hfr SM955-I30, con la cual se observó la entrada del gen para utilización del L-aspartato en el minuto 7.56 (Fig. 10). Los resultados se corrigieron para la posición del plásmido F en el cromosoma, para el sentido de la donación y para cien minutos de conjugación (Sanderson et al, 1987)

Al tratar de hacer la localización con la cepa Hfr SM536-I21, no se pudieron obtener transconjugantes, ya que aparentemente la cepa había perdido el plásmido que le confería la capacidad de ser Hfr.

TRANSPORTE DE L-ASPARTATO MARCADO RADIOACTIVAMENTE

Se escogió la cepa SM534-I31 para hacer el análisis del transporte de L-aspartato. Como testigo se utilizó la clona SM-1P (Asp U-) derivada de la LT-2, ya que las Hfr usadas derivaron originalmente de la LT-2.

Los resultados son los siguientes:

1) Al crecer a la mutante en MM Gol por 24 horas se encontró que el transporte no tenía diferencias significativas con respecto a la cepa parental, aunque en la mutante se observaron niveles de transporte ligeramente mayores en comparación con la cepa silvestre (Fig. 11). Sin embargo, cuando se incubaron ambas cepas en este medio de cultivo adicionado con L-aspartato e incubándolas durante 48 horas, se encontró una marcada diferencia, ya que la cepa parental sólo presentó el nivel basal de transporte y la mutante mostró un transporte sumamente aumentado (Fig. 12)

COMPETENCIA POR EL TRANSPORTE

En la figura 13 se puede apreciar que en la mutante el L-aspartato y D-aspartato fríos, compitieron por el transporte de L-aspartato, puesto que disminuyeron completamente el transporte del L-aspartato marcado radioactivamente. El tartrato de sodio, D-L-treo- β -hidroxiaspartato presentaron menor inhibición, comparándola con los análogos anteriores que inhibieron claramente el transporte. D-glutamato, L-glutamato, α -metilglutamato, β -metilaspartato y homocisteato, no inhibieron el transporte de L-aspartato marcado o lo hicieron en mucho menor grado.

En la cepa silvestre se encontró una clara disminución del transporte de L-aspartato marcado con D-aspartato, mientras que el resto de los análogos, homocisteato, D-L-treo- β -hidroxiaspartato,

D-glutamato, L-glutamato, L-aspartato y tartrato de sodio, α -metilglutamato y β -metilaspártato, mostraron muy ligera inhibición (Fig 14).

DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos podemos decir que las cepas silvestres de *Salmonella typhimurium* LT-2, SA534 y SA536, están formadas por poblaciones heterogéneas, ya que presentan variabilidad poblacional con respecto a la utilización de L-aspartato como única fuente de carbono y de energía. Esto se demostró al crecer la cepas en altas concentraciones de L-aspartato, puesto que se obtienen clonas que no utilizan esta fuente de carbono y clonas que pueden utilizarla lentamente. Además muestran un marcado efecto de concentración, ya que al ir aumentando la concentración del L-aspartato se ve un aumento en el tamaño de las colonias. Esto no se observa en la cepa SA955, que está formada por una población homogénea que además no presenta efecto de concentración, es decir no aumenta el tamaño de las colonias al aumentar la concentración de la fuente de carbono. En altas concentraciones de L-aspartato, aumenta la frecuencia de mutantes espontáneas, esto concuerda con lo observado por Frank y Hopkins (1969) para L- glutamato y con Zonana (1991) para β -glicerolfosfato. Con estos resultados se puede ver que existen cepas que poseen un alto índice de mutantes espontáneas con la capacidad de utilizar L-aspartato como única fuente de carbono y

cepas que presentan un índice de mutantes espontáneas muy bajo. Esto podría deberse a que los eventos mutacionales que llevan a la aparición de mutantes espontáneas, están distribuidos al azar entre cada cultivo y algunos cultivos cuando por casualidad sufren una mutación temprana en su crecimiento, terminan con un gran número de mutantes, es decir si la mutación ocurre durante el crecimiento del cultivo, el número de mutantes puede ser grande y cuando la mutación ocurre tiempo después, el número de mutantes es pequeño (Luria et al; 1943), esto pudo haber sucedido en la cepa SA955. Esto podría ayudar a la obtención de este tipo de mutantes, sin ningún tipo de tratamiento mutagénico. La mayor posibilidad de obtener mutantes cuando se usan altas concentraciones de la fuente de carbono puede deberse a que, en cualquier población sujeta a cierta forma de presión selectiva, surgen variantes que poseen cambios favorables en su secuencia de ADN, produciendo cambios apropiados en el fenotipo (Cairns et al, 1988) en este caso la capacidad de utilizar L-aspartato como fuente de carbono y energía. Al poner a la población en bajas concentraciones de L-aspartato como fuente de carbono hay una presión selectiva que favorece la proliferación de las mutantes ya existentes, pero al aumentar la concentración del L-aspartato, aumenta la presión selectiva, con lo cual se podría decir, se está induciendo fisiológicamente a la población y por lo tanto a la aparición de mutantes para su subsecuente proliferación en la población. Al existir cepas más estables que otras, como es el caso de SA955, este método de obtención de mutantes no sería útil, por su

población homogénea y su gran estabilidad.

La obtención de mutantes inducidas para la utilización de L-aspartato con marca de auxotrofia no se pudo lograr a pesar de haber utilizado NTG, ya que se ha observado que este agente mutagénico induce mutaciones vecinales, probablemente en este caso no se encuentra ningún gen relacionado con la biosíntesis de aminoácidos, vitaminas o bases cerca del gen de utilización de L-aspartato. Otra posibilidad es que la probabilidad de obtener estas mutantes sea muy baja, igual que en las espontáneas, y no se haya estudiado un número suficiente de células.

Cuando se creció a la cepa silvestre de *S. typhimurium* en MM Asp en presencia de hidróxido de sodio, no se observó un aumento en la utilización de esta fuente de carbono, a diferencia del transporte de L-glutamato codificado por el operón *gltS-gltR* en *E. coli* en que sí se ve favorecido por la presencia del sodio, esto lo habían observado con anterioridad Frank y Hopkins (1969). Ellos encontraron que sólo el transporte de L-glutamato se favorecía, con lo cual se puede decir que a pesar de que ambos aminoácidos comparten algunos sistemas de transporte, no presentan las mismas características.

Al obtener las mutantes capaces de utilizar L-aspartato como única fuente de carbono, se verificó que no se afectara la capacidad de utilizar otras fuentes de carbono, como es el caso

de glicerol y de glucosa, para glucosa todas las mutantes conservaron la capacidad de utilizarla normalmente, pero en el caso de glicerol en las mutantes SM536-I21 y SM-E3 se vio afectada la utilización de éste, ya que eran auxótrofas a cisteína, sólomente cuando se crecían en glicerol esto se observó tanto en la mutante espontánea como en la inducida. Esto quiere decir que probablemente hay una relación entre la vía de utilización de glicerol y este requerimiento, pero este fenómeno no se estudio a fondo. Además estas mutantes presentan la capacidad de utilizar L-glutamato al igual que L-aspartato. Un tipo de auxotrofia semejante lo observaron Parada y Ortega (1967) en mutantes de *Salmonella typhimurium* que requerian de tiamina o tiazol para su crecimiento exclusivamente en hexosas.

Cuando se hizo la localización genética con la cepa Hfr534-I31 y con la SA955, se observó que el gen de utilización de L-aspartato como única fuente de carbono se localiza en el minuto 7.5. Entre el minuto siete y ocho no se han localizado, hasta el momento, genes relacionados con el transporte de L-glutamato o de L-aspartato. Lo más cercano a este minuto es el gen *aspU*, en *S. typhimurium*, y en *E. coli* se localiza además el gen *aspV* ambos genes se encargan de la biosíntesis de aspartato y se localizan en el minuto cinco del cromosoma bacteriano.

Al probar la sensibilidad a algunos análogos tóxicos del L-aspartato, utilizando a éste como única fuente de carbono, se

encontraron dos sistemas. El primero es un sistema compartido por L-aspartato y L-glutamato, el cual es sensible a D-glutamato, este sistema comparte estas características con el operón *gltC-gltS*, localizado en *S. typhimurium* por Alvarez y sus colaboradores (1986), ya que también transporta ambos aminoácidos y es sensible a D-glutamato, además de ser sensible a α -metilglutamato y homocisteato, la sensibilidad a estos últimos dos compuestos no se observó en el sistema que se estudió en este trabajo.

El segundo sistema transporta exclusivamente L-aspartato, es altamente sensible a D-aspartato y con menor sensibilidad a D-L-treo- β -hidroxiaspartato, este sistema es el exclusivo de L-aspartato que hasta el momento sólo se ha caracterizado en *E. coli* ya que ambos presentan sensibilidad a los mismos análogos tóxicos del L-aspartato. Se observó que este sistema de transporte tardó mucho tiempo en inducirse, esto puede ser por el medio que se empleó para realizar los experimentos de transporte, el cual fue *gol+asp*. Probablemente el glicerol interfirió en la utilización del L-aspartato ya que las cepas obtenidas en este trabajo utilizan glicerol con mayor facilidad que el L-aspartato, por lo cual hasta que se agotaba esta fuente de carbono se inducía el transporte de L-aspartato. Este medio de cultivo se utilizó debido a que la cepa SM-1P no puede utilizar L-aspartato como única fuente de carbono.

CONCLUSIONES

- 1) Las cepas LT-2, Hfr534 y SA536, son poblaciones heterogéneas con un marcado efecto de concentración.
- 2) La cepa SA955 está formada por una población homogénea y no presenta efecto de concentración.
- 3) Aparentemente existe una relación entre la utilización de L-aspartato y L-glutamato, con la utilización de glicerol.
- 4) El sodio no favorece el transporte de L-aspartato en *Salmonella typhimurium* LT-2.
- 5) Se caracterizaron 2 sistemas de transporte diferentes.
 - i) Sistema de transporte compartido por L-aspartato y L-glutamato, sensible a D-glutamato e independiente de sodio.
 - ii) Sistema de transporte exclusivo para L-aspartato, sensible a D-aspartato y D-L-treo- β -hidroxiaspartato e inducible que se localiza en el minuto 7.5 del cromosoma bacteriano.

TABLA I. SENSIBILIDAD EN EL CRECIMIENTO^a EN PRESENCIA DE ANALOGOS DE L-ASPARTATO EN LOS DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE LOCALIZADOS EN *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

| Sistema | <i>S. typhimurium</i> ^b | | | <i>E. coli</i> ^c | |
|---------------------------|------------------------------------|----------------|-------------|-----------------------------|----------------|
| | <i>gltS</i> | <i>gltR</i> | <i>gltF</i> | <i>gltS</i> | <i>gltP</i> |
| Localización | min 80 | min 90 | min 0 | min 80 | min 92. |
| Transporte | L-asp L-glt | L-asp L-glt | L-glt | L-glt | L-asp L-glt |
| Inhibidores | | | | | |
| L-Aspartato | s | s | r | ND | ND |
| D-Aspartato | r | r | r | ND | ND |
| D-glutamato | r | r | r | s | r |
| L-Asparagina | r | r | r | ND | ND |
| L-Glutamina | r | r | r | ND | ND |
| Cisteico | s | s | r | r | s |
| β -Hidroxiaspartato | s | s | r | r | s |
| α -metilgutamato | r | r | s | s | r |
| Homocisteico | ND | ND | ND | s | r |

a. (s) sensibilidad, (r) resistencia, (ND) no determinado.

b. tomado de Sanderson K.E. et al (1987)

c. tomado de Bachmann.J. et al (1987)

TABLA II. CEPAS DE *Salmonella typhimurium* QUE SE EMPLEARON EN ESTE TRABAJO.

| CEPA | CARACTERISTICAS | | MIN. DE ENTRADA |
|------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| LT-2 | cepa silvestre F- | AspU-,GltU- | |
| SA534* | cepa silvestre Hfr. | AspU-,GltU- | 98 CW |
| SA536* | cepa silvestre Hfr. | AspU-,GltU- | 76 CW |
| SA955* | cepa silvestre Hfr. | AspU-,GltU- | 15 CCW |
| SM955-I5 | mutante derivada de SA955 Hfr. | AspU+,GltU- | 15 CCW |
| SM955-I30 | mutante derivada de SA955 Hfr. | AspU+,GltU- | 15 CCW |
| SM536I-I21 | mutante derivada de SA536 Hfr. | AspU+,GltU+ | 76 CW |
| SM534-I31 | mutante derivada de Hfr534 F-. | AspU+,GltU- | 98 CW |
| SM-E3 | mutante derivada de LT-2 Hfr. | AspU+,GltU+ (Lenta) | |
| SM-1P | clona pequeña de LT-2 F-. | AspU-,GltU- | |
| SM-E1P | mutante derivada de SM-1P F-. | AspU-,GltU-estreptomicina resistente | |

E = mutante espontánea.

I = mutante inducida con NTG.

* Cepas derivadas originalmente de LT-2.

CW: Entrada del cromosoma en dirección de las manecillas del reloj.

CCW: Entrada del cromosoma en dirección contraria de las manecillas del reloj

TABLA III. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE L-ASPARTATO COMO UNICA FUENTE DE CARBONO EN LA APARICION DE MUTANTES ESPONTANEAS DE *Salmonella typhimurium*.

| Fuente de carbono y concetra- cion | LT-2 | SA534 | SA955 | SA536 |
|---------------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| Asp 0.4% | 3.5×10^{-7} | 1×10^{-8} | 2×10^{-9} | 4.5×10^{-8} |
| Asp 1% | 5×10^{-2} | 2×10^{-3} | 2.5×10^{-6} | 4×10^{-3} |
| Asp 2% | 5×10^{-2} | 2×10^{-3} | 3×10^{-6} | 7.5×10^{-3} |

. Sólo se contaron las clonas grandes.

TABLA IV. FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA DE CLONAS PEQUEÑAS DE *Salmonella typhimurium* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE L-ASPARTATO

| CLONAS | PROCEDENCIA | F. M. E. | CONC. ASP |
|--------|-------------|----------------------|-----------|
| SM-1P | LT-2 | 4.1×10^{-9} | asp 0.4% |
| | | 3.4×10^{-9} | asp 1% |
| | | 5.3×10^{-9} | asp 2% |
| SM534P | SA534 | 3.2×10^{-9} | asp 0.4% |
| | | 3.8×10^{-9} | asp 1% |
| | | 4.4×10^{-9} | asp 2% |
| SM536P | SA536 | 5×10^{-8} | asp 0.4% |
| | | 4.1×10^{-8} | asp 1% |
| | | 5×10^{-8} | asp 2% |

Frecuencia de mutantes espontaneas (F.M.E.)

TABLA V. MUTANTES DE *Salmonella typhimurium* INDUCIDAS CON NTG OBTENIDAS EN ESTE TRABAJO.

| | L-ASP U+ | L-ASP U+ AUXOTROFAS | CRECIMIENTO EN L-ASPARTATO. | |
|--------|----------|---------------------|-----------------------------|---------|
| | | | 24 HORAS | 8 HORAS |
| SM-1P | 10,315 | NINGUNA | 13 | ND |
| SM534P | 225 | ND | 12 | 5 |
| SM536P | 150 | ND | 7 | 2 |
| SM955P | 150 | ND | 2 | 2 |

TABLA VI. SENSIBILIDAD EN EL CRECIMIENTO A ALGUNOS ANALOGOS DE L-ASPARTATO DE LAS DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella typhimurium* EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

| | SM-1P | SM534-I31 | SM955-I5 | SM955-I30 | SM-E3 | SM536-I21 |
|----------------------------|-------|-----------|----------|-----------|-------|-----------|
| D-Glutamato | - | r | r | r | s | s |
| D-Aspartato | - | s | s | s | r | r |
| β -Hidroxi-aspartato | - | r | r | r | r | r |
| α -Metilglutamato | - | r | r | r | r | r |
| β -Metilaspartato | - | r | r | r | r | r |
| Cisteato | - | r | r | r | r | r |
| Homocisteato | - | r | r | r | r | r |
| Tartrato de sodio | - | s | s | s | s | s |

El experimento se realizó en placas de L-aspartato al 0.4% como única fuente de carbono.

(r) resistencia, (s) sensibilidad, (-) no hubo crecimiento.

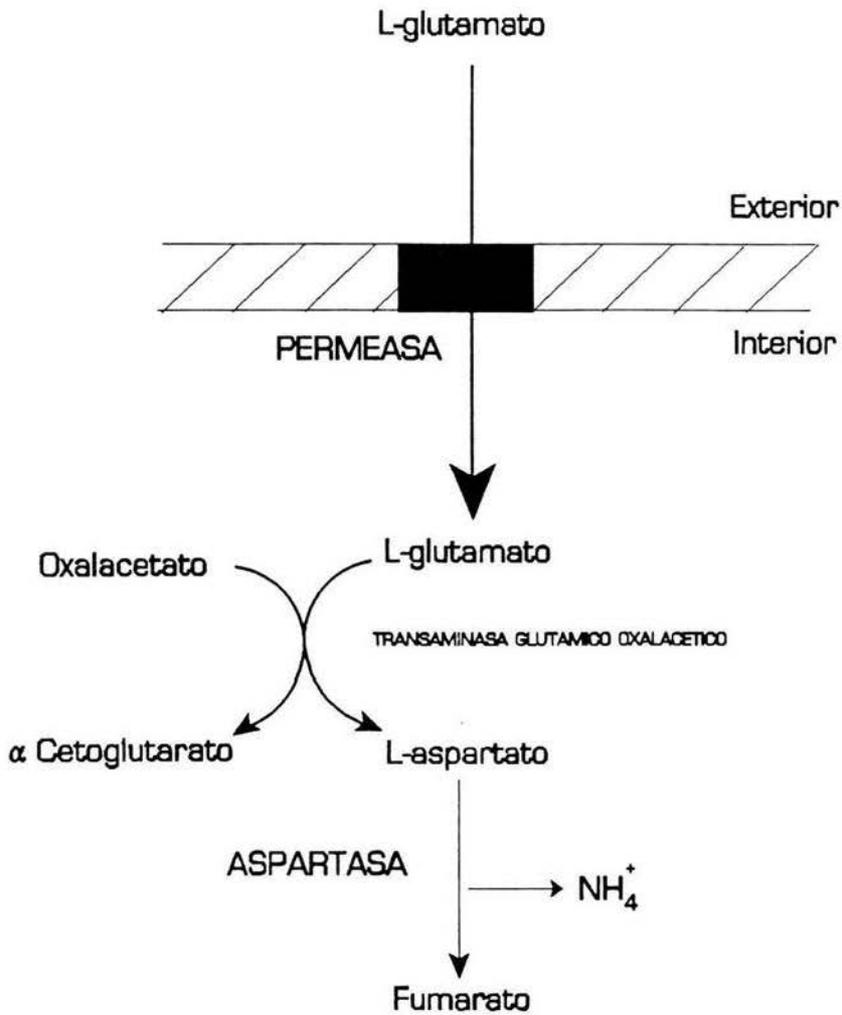


Fig.1. Metabolismo de L-glutamato y L-aspartato en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

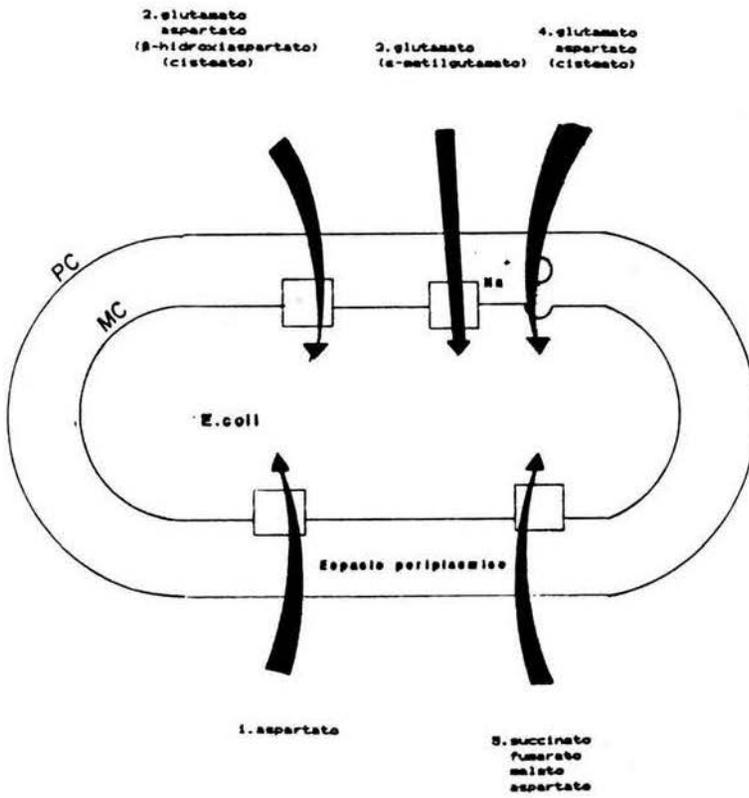


Fig 2. Sistemas de transporte que se han caracterizado bioquímicamente en *Escherichia coli*

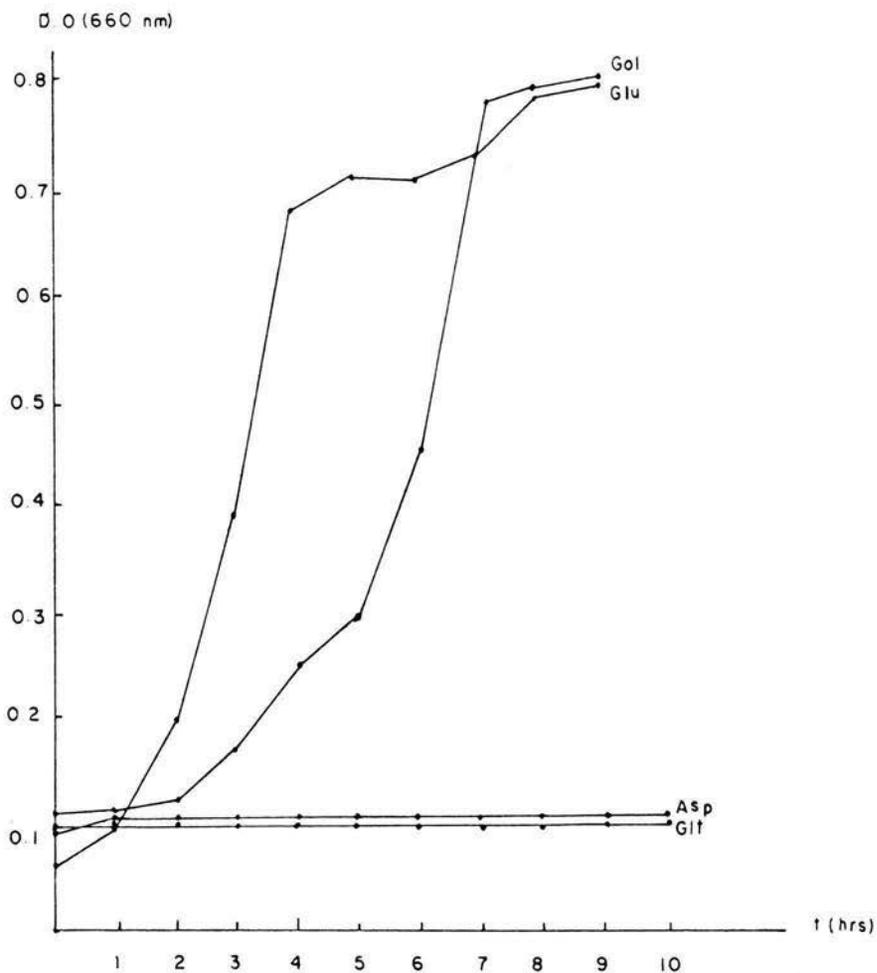


Fig 3. Curva de crecimiento de la cepa SM-1P, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

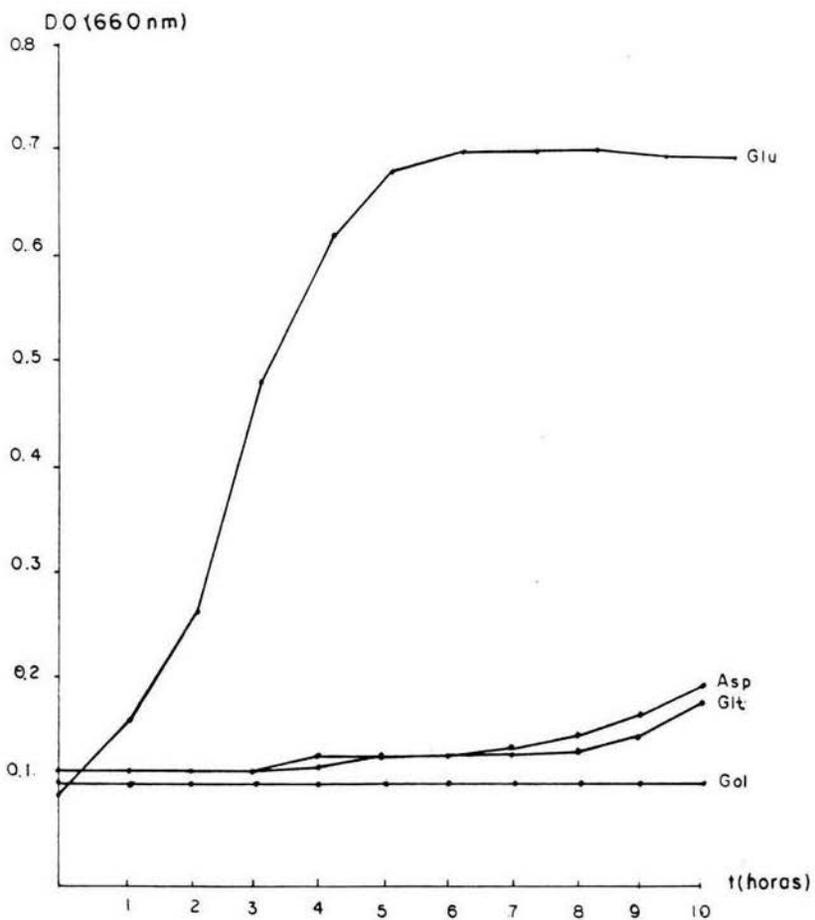


Fig 4. Curva de crecimiento de la cepa SM-E3, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

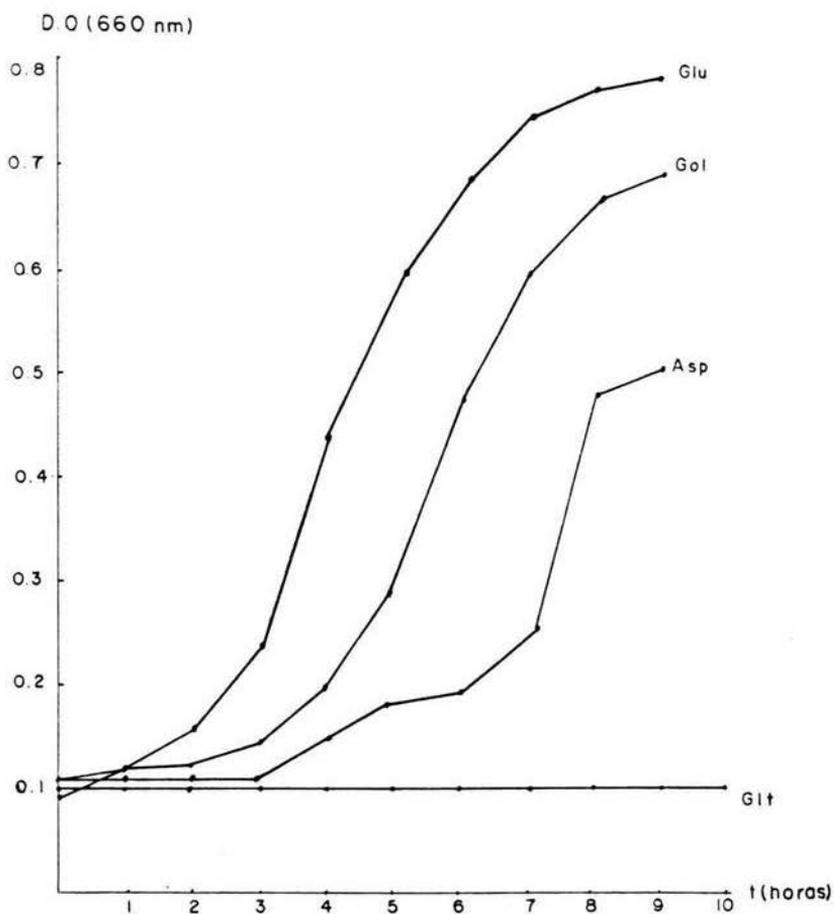


Fig. 5. Curva de crecimiento de la cepa SM534-I31, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

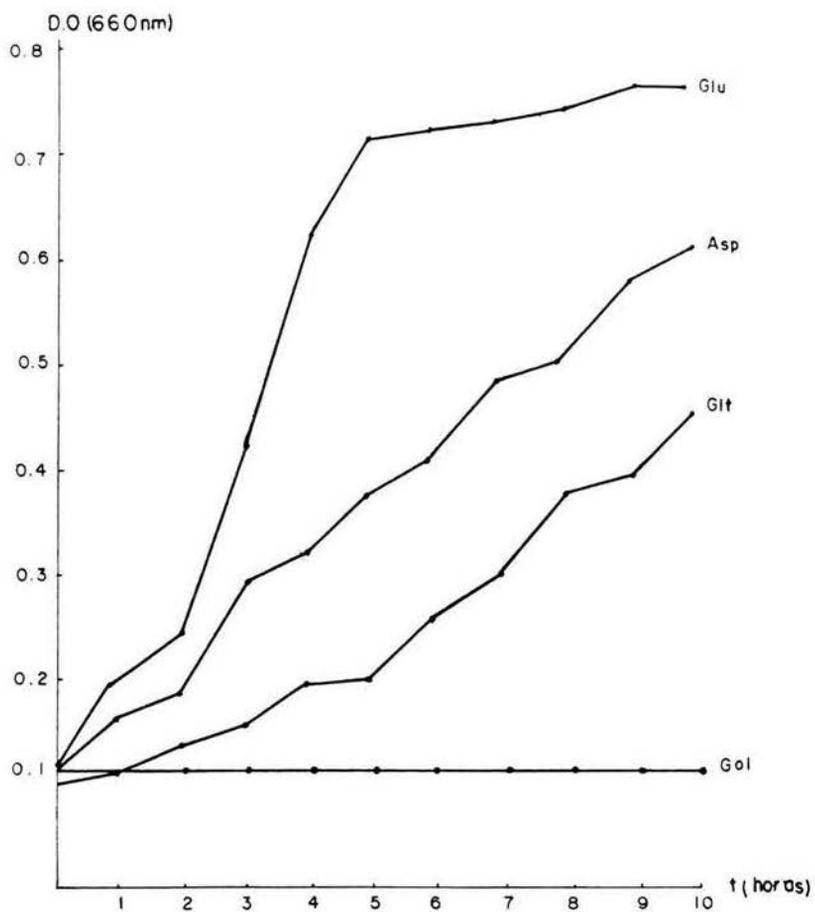


Fig.6. Curva de crecimiento de la cepa SM536-I21, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

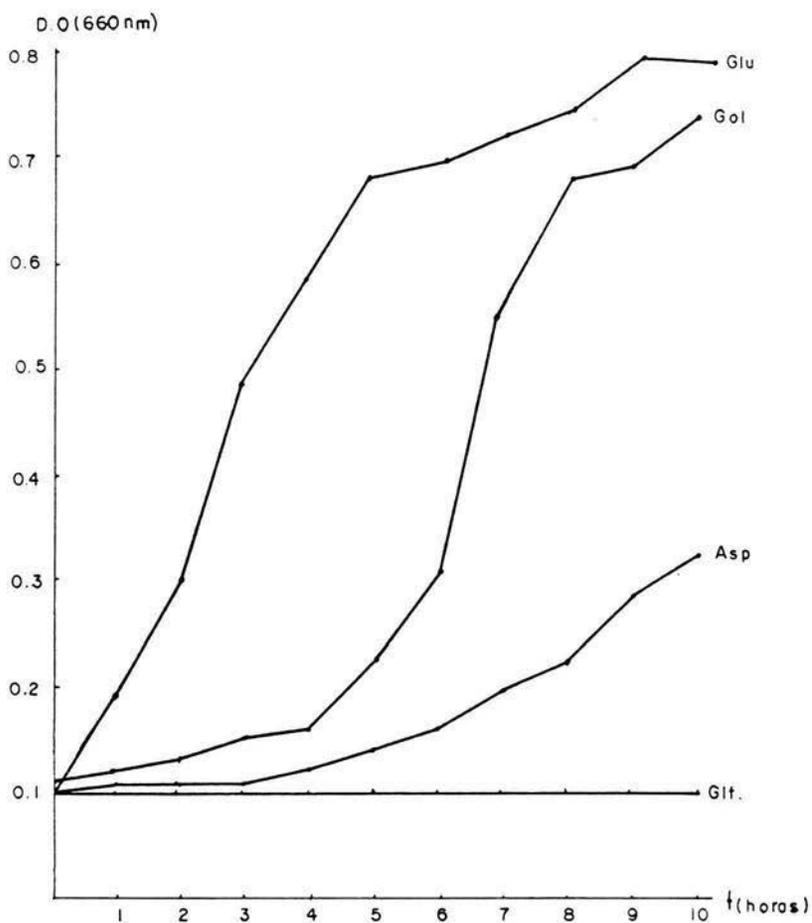


Fig.7. Curva de crecimiento de la cepa SM955-I5, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

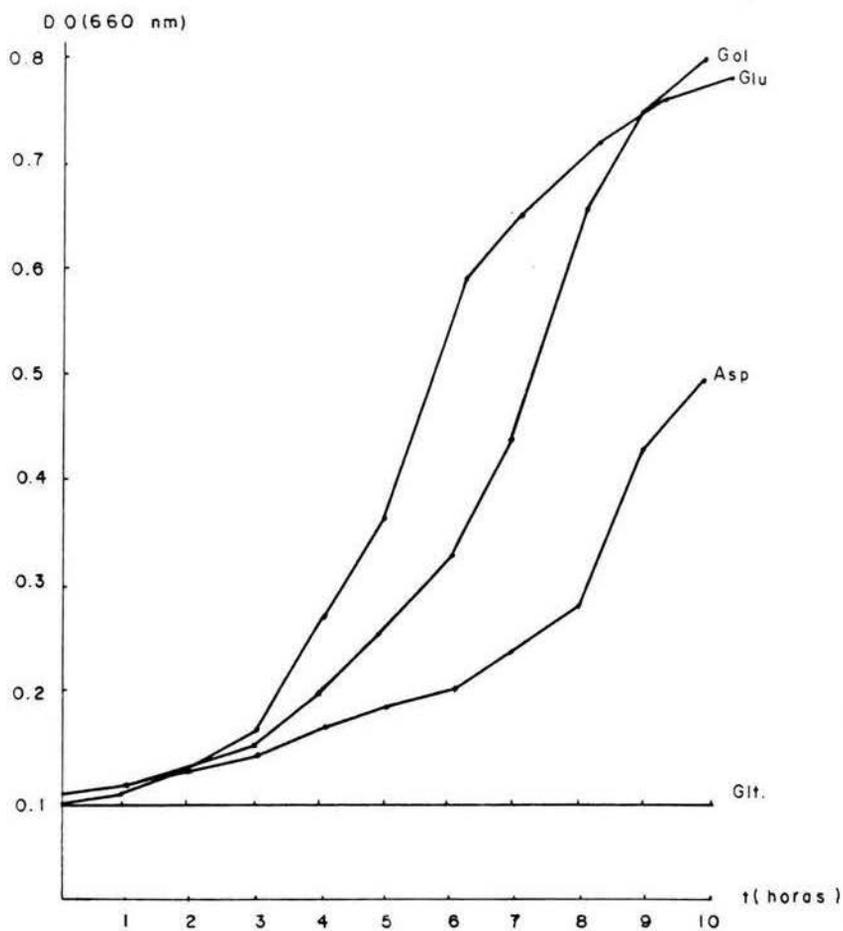


Fig.8. Curva de crecimiento de la cepa SM955-I30, en diferentes fuentes de carbono, después de 2 pases consecutivos en MM Gol.

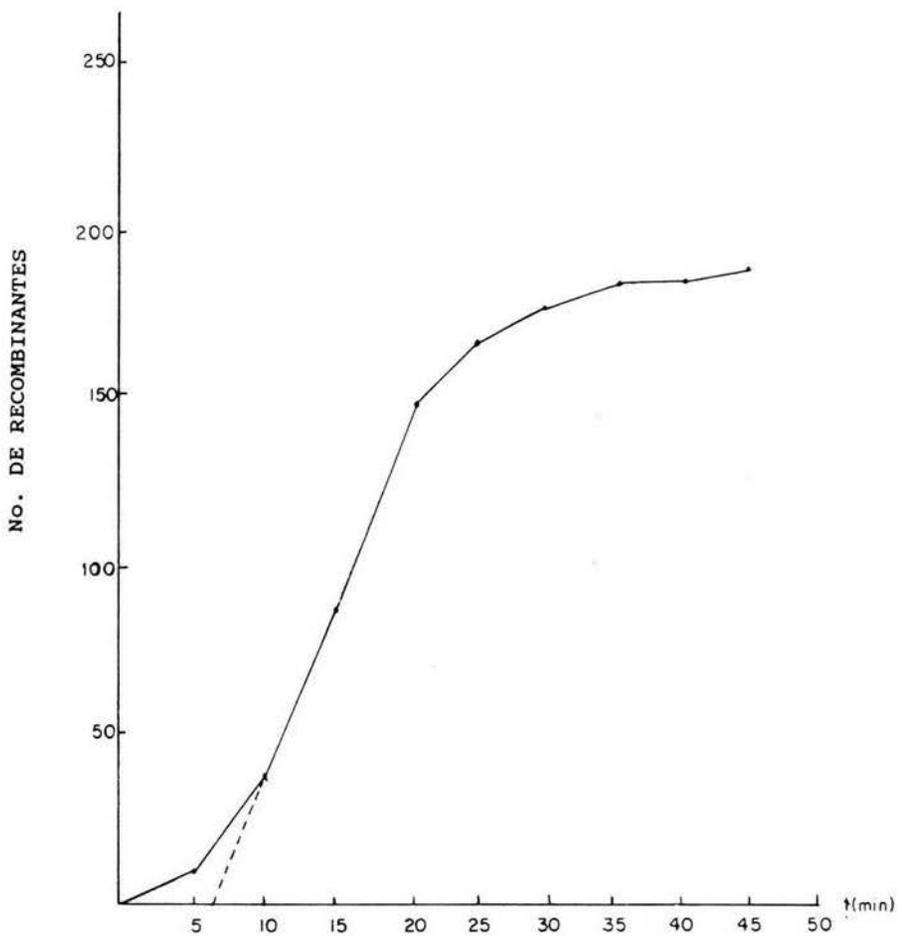


Fig.9. Conjugación de la cepa SM-E1P, como receptora y SM534-I31 como donadora. Este experimento se realizo en MM Gol+E.L, al 1% y al 0.005%, respectivamente. Las muestras se tomaron cada cinco minutos.

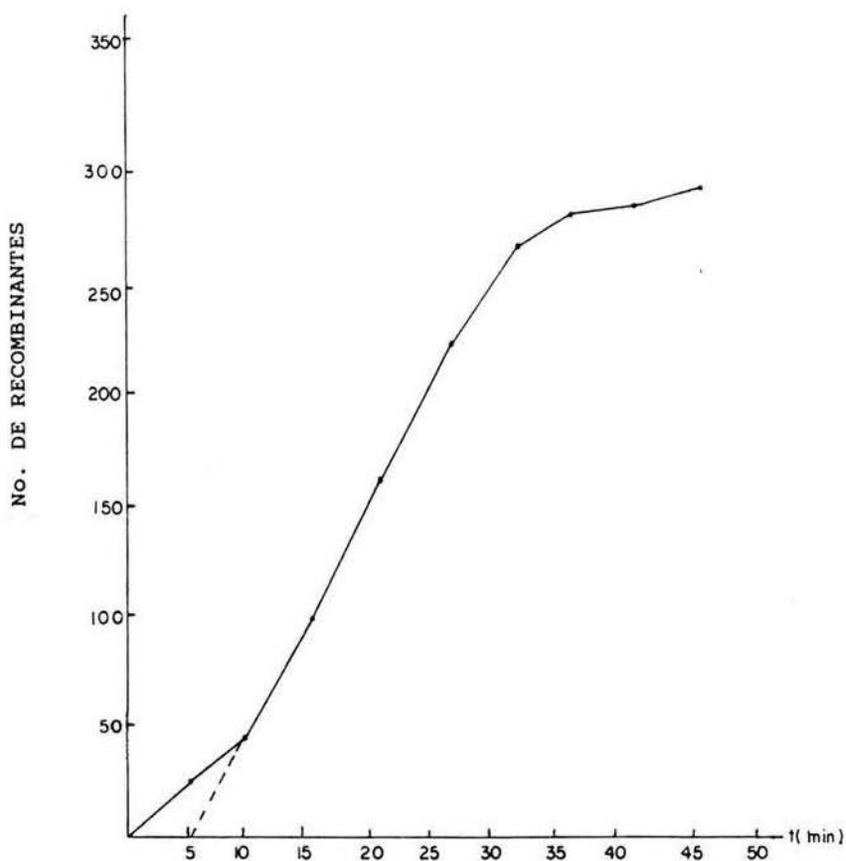


Fig.10. Conjugación de la cepa SM-E1P, como receptora y SM955-I5 como donadora. El experimento se realizó en MM Gol+E.L, al 1% y al 0.005%, respectivamente. Las muestras se tomaron cada cinco minutos

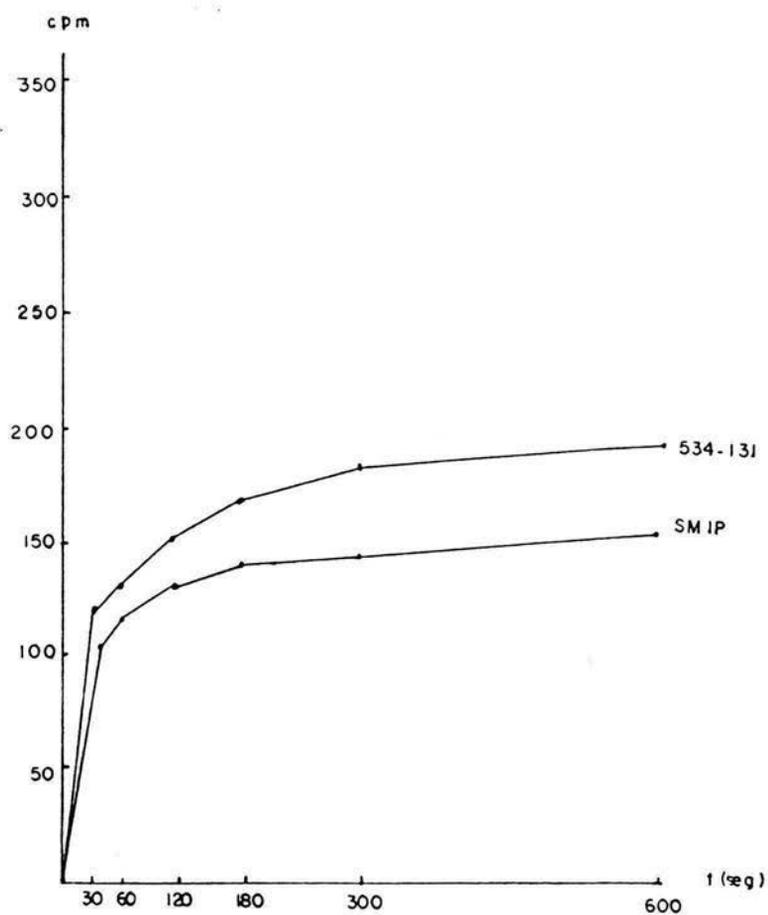


Fig.11. Cinetica de transporte de ^{14}C -L-aspartato en las cepas SM-1p y SM534-I31. Las cepas se crecieron en y en MM Gol, durante 24 horas para después cosecharla, detener su síntesis de proteínas con cloranfenicol y adicionarle el aspartato marcado.

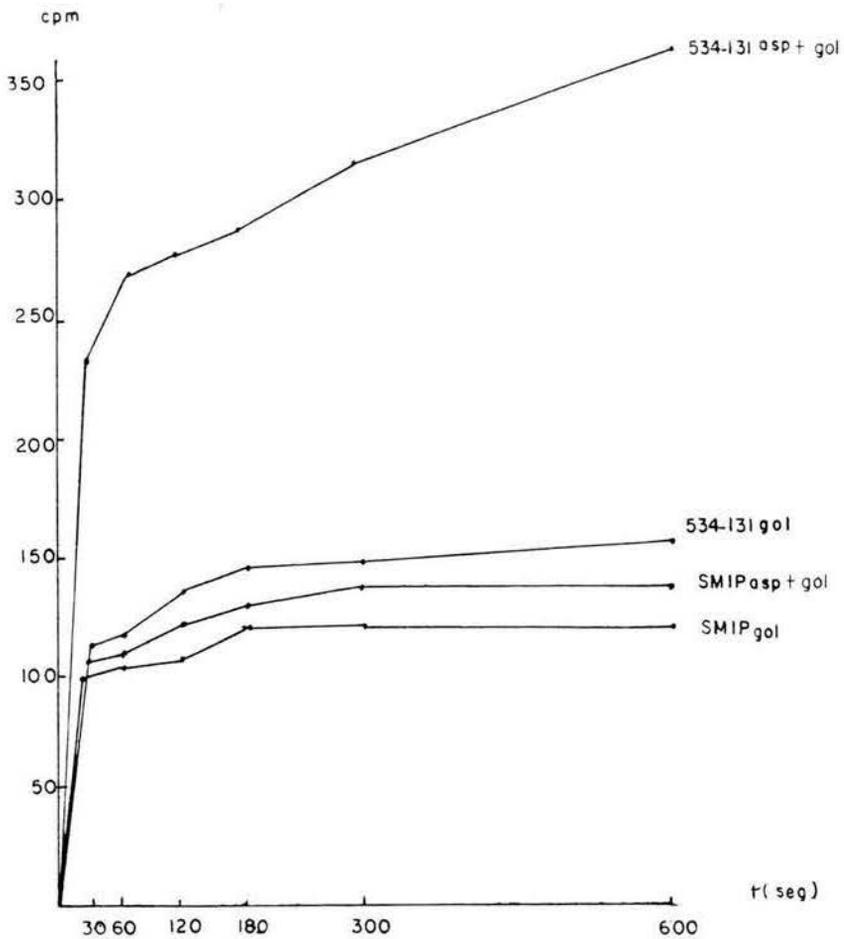


Fig.12. Cinetica de transporte de ^{14}C -L-aspartato en las cepas SM-1p y SM534-I31. Las cepas se crecieron en MM Gol o en MM Asp+Gol durante 48 horas para después cosecharlas, detener su síntesis de proteínas con cloranfenicol y adicionarle el aspartato marcado.

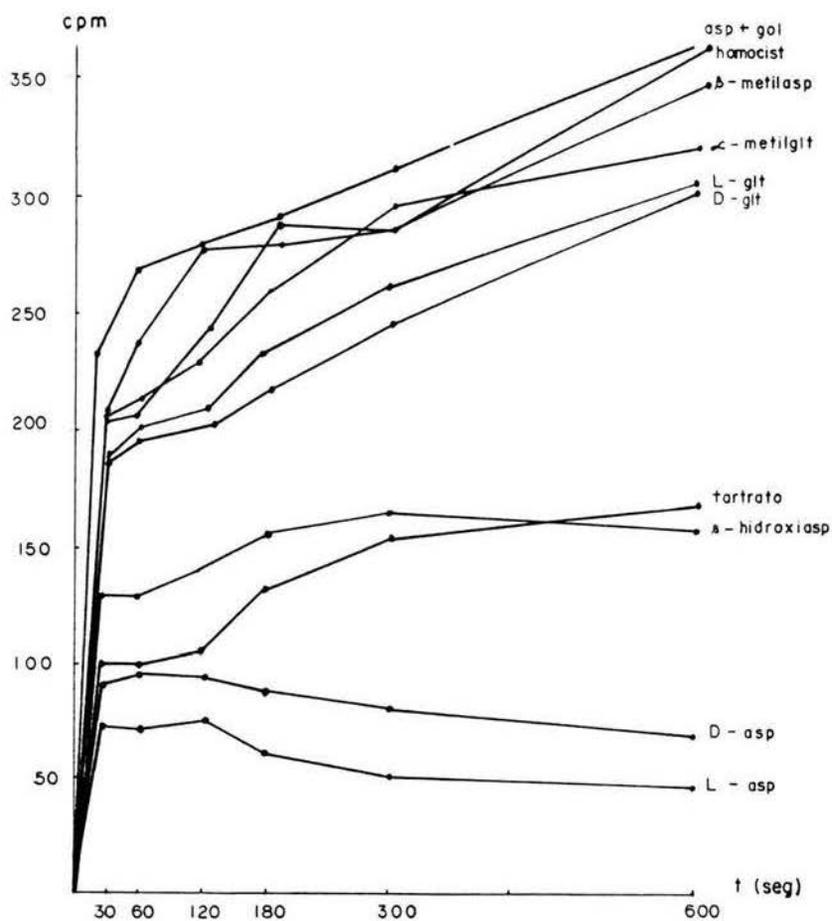


Fig.13. Cinetica de transporte de ^{14}C -L-aspartato en la cepa SM534-I31. La cepa se crecio en MM Asp+Gol, durante 48 horas para después cosecharla, detener su sintesis de proteínas con cloranfenicol y adicionarle el aspartato marcado.

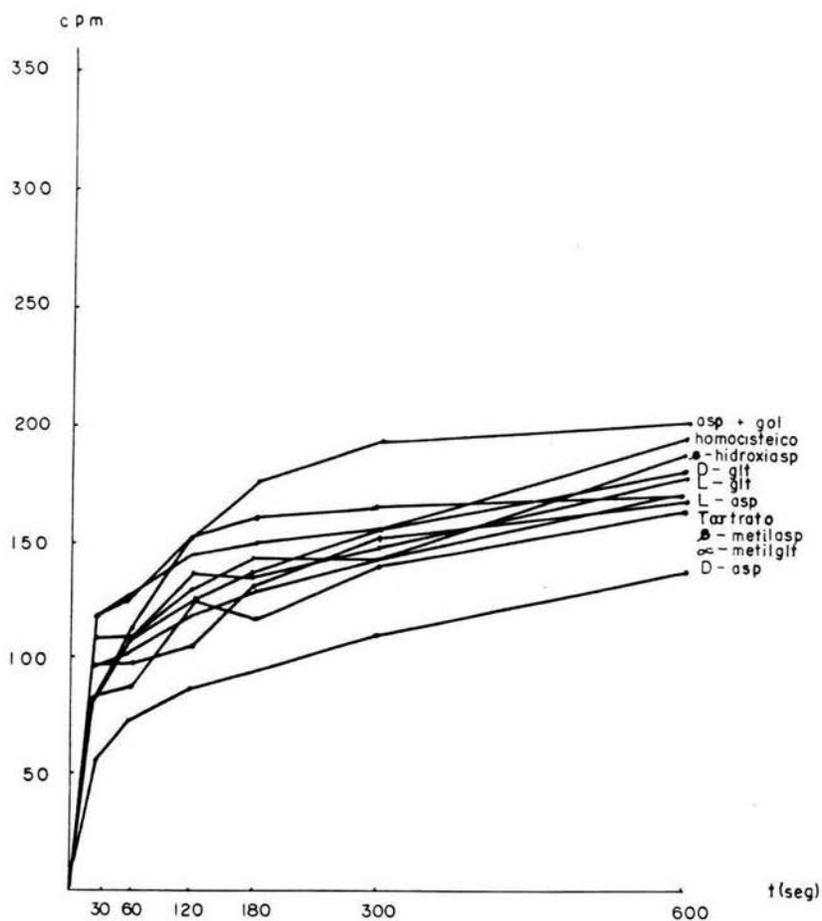


Fig.14. Cinetica de transporte de ^{14}C -L-aspartato en la cepa SM-1P. La cepa se crecio en MM Asp+Gol por 48 horas para después cosecharla y detener su sintesis de proteínas con cloranfenicol y adicionarle el aspartato marcado y los análogos tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, J., DE LA GARZA, M., ORTEGA, M. (1986) Biochemical and Genetic Characterization of L-Glutamate Transport and Utilization in *Salmonella typhimurium* LT-2 Mutants. *Biochem. Genet.* 24:314.

- AKSAMIT, R., HOWLWTT, J., KOSLAND, E. (1975) Soluble and Membrane-Bound Aspartate-Binding Activities in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 123:3.

- BACHMAN, J.B. (1987) Linkage Map of *Escherichia coli* K-12 Edition 7. En: Neidharth C.F. Ed, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Vol 1. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., USA

- BENDER, J., (1975) The Assimilation of Ammonia. En: Amino Acid Metabolism. Academic Press, Inc. New York. USA.

- BOOTH, J., KLEPPANG.K.E., KEMPESELL.K.E. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135; 2767-2774.

- CAIRNS, J., OVERBAUGH, J. MILLER, S (1988) The origin of mutants. *Nature.* 335:142-145.

- DALE, W.J. (1989) Regulation of Gene Expression. En: Molecular Genetics of Bacteria. Academic Press, Inc. New York. USA.

-DEGUCHI, Y., YAMOTO, I., ANRAKU, I., YASUHIRO. (1989) Molecular Cloning of *gltS* and *gltP*, Which Encode Glutamate Carriers of *Escherichia coli* B. J. Bac. 171: 1314-1319.

-ESSENBERG, R. (1984) Use of Homocysteic Acid for Selecting Mutants at the *gltS* Locus of *Escherichia coli* K12. J.Gen.Microbiol. 130:1311-1314.

-FRANK, L., HOPKINS, I. (1969) Sodium-Stimulated Transport of Glutamate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 100:329-336

-FERROLUZZI, G.M. (1964) Uptake of Amino Acids by *Salmonella typhimurium*. Arch. Biochem. Biophys. 104:1-8.

- FURLONG. (1987) Osmotic-Shock-Sensitive Transport Systems. En: Neidhart C.F. [Ed.], *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular biology. Vol.1. Am. Soc.Microbiol. Washington, D.C. USA.

- GUTNICK, D., CALVO, M., KLOPOTOWSKI, T., AMES BRUCE. (1969) Compound Which Serve as the Sole Source of Carbon or Nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT-2. J. Bacteriol. 100:1.

- HALPERN, Y.S., UMBARGER, H.E. (1961) Utilization of L-Glutamate and 2-Oxoglutaric Acid as Sole Source of carbon by *Escherichia coli*. J.Gen.Microbiol. 26:175-183.

-HALPERN, Y.S., UMBARGER, H.E. (1960) Conversion of Ammonia a amino Groups in *Escherichia coli* J. Bacteriol. 90;285.

- HALPERN, Y.S., LUPO, M. (1965) Glutamate Transport in Wild-Type and Mutants Strains of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 90:1288-1295.

- HALPERN, Y.S., BARASH, H., DRUCK, K. (1973) Glutamate Transport in *Escherichia coli* K-12: Nonidentity of Carriers mediating Entry and Exit. J.Bacteriol. 113:51-57.

- HALPERN, Y.S. EVEN-SHOSHAN. (1967) Properties of Glutamate Transport Sistem in *Escherichia coli* J.Bacteriol. 93:1009-1016.

- KALMAN, M., GENTRY, D.R., CASHEL, M. (1991) Characterization of the *Escherichia coli* K-12 *gltS* glutamate permease gene. Mol. Gen. Genet. 225:379-386.

- KAY, W.W., CAMERON, M.J. (1978) Transport of C4 Dicarboxilic Acid in *Salmonella typhimurium*. Arch. Biochem. Biophys. 190:281-289.

- KAY, W.W. (1971) Two Aspartate Transport systems in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 246:7373-7382.

-LEDEBERG, J., LEDEBERG, E.M. (1952) Replicating and Indirect Selection of Bacteria with Penicillin. J. Am. Chem. Soc. 70: 4267-

4268.

-LOMBARDI, F., KABAK, R. (1972) Mechanism of Active Transport in Isolated Bacterial membrane Vesicles. J. Am. Chem. Soc. 70. 4267-4268.

-LURIA, S.E, DELBRUCK, M. (1943) Mutation of Bacteria from Virus Sensitivity to virus resistance. Genet. 28:491-511.

-MAGASANIK, B., NEIDHART, F.C. (1987) Regulation of Carbon and Nitrogen Utilization. En: Neidhart C.F. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Vol2. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. USA.

-MARCUS, M., HALPER, Y.S. (1967) Genetic Analysis of Glutamate Descarboxylase in *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 93:1409-1415.

- MARCUS, M., HALPERN, Y.S. (1969) Mapping of the Aspartase Gene in *Escherichia coli* K12. J. Med. Sci. 5:413-415.

- MARCUS, M., HALPERN, Y.S. (1969) Genetic and Physiological Analysis of Glutamate Descarboxilase in *Escherichia coli* K12. J.Bacteriol. 97:1509-1510.

- MARCUS, M., HALPERN, Y.S. (1969) Genetic Analisis of the Glutamate Permease in *Escherichia coli* K-12. J. Bac. 97: 1118-1128.

- PARADA, J.L. ORTEGA, M.V. AND CARRILLO, C.G. (1973) Biochemical and Genetic Characteristics of the C₄-Dicarboxylic Acids Transport System of *Salmonella typhimurium*. Arch. Microbiol. 94, 65-76.

- ROTH, J.R. (1970) Genetic Techniques in Studies of Bacterial Metabolism. En Metabolism of Amino Acids and Amines. Ed. H. Tabor., C.W. Tabor. Ac. Press. N.Y. USA.

- SANDERSON, K.E., HURLEY, J. A.(1987) Linkage Map of *Salmonella typhimurium*. En: Neidhart C.F. Ed. Cellular and Molecular Biology. vol 1. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., USA.

- Sanchez, M.E., Jouve, N. (1982) Genetica. Ed. Omega. Barcelona España. 197-199.

- SHELLEMBERG, D., FURLONG, C. (1977) Resolution of the Multiplicity of the Glutamate and Aspartate Transport Systems of *Escherichia coli*. J.Biol. Chem. 252:9055-9064.

- VENDER, J., JAYARAMA, K., RICKENBERG, V. (1965) Metabolism of Glutamic Acid in Mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 90:1304-1307.

- WILLIAM, R., FURLONG, C. (1975) Purification properties of Periplasmic Glutamate Aspartate Binding Protein from *Escherichia coli* K12 Strain W3092. J.Biol.Chem. 250:2574-2580.

-ZONANA.M. (1991) Estudio de Mutagenesis en *Salmonella typhimurium* para la Utilización de β -Glicerolfosfato. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. Edo. de Méx.