

T.  
Zej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores "CUAUTITLAN"

" ESTUDIO DEL HINCHAMIENTO CELULAR EN  
SALMONELLA TYPHIMURIUM LT - 2 Y SU  
RELACION CON POTASIO "

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ROSA LAURA CIENFUEGOS SANCTORUM

Director de Tesis

Dra. Mireya De la Garza Amaya

México, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## I N D I C E

	pag.
Abreviaturas utilizadas.	x
Índice de Figuras.	xii
Resumen.	xiii
I. - INTRODUCCION.	1
II. - OBJETIVOS.	9
III. - MATERIALES Y METODOS.	
A. - MATERIALES.	
1. - Cepas de <u>Salmonella typhimurium</u> LT-2	10
2. - Conservación de las cepas bacterianas.	10
3. - Reactivos químicos.	10
4. - Medios de cultivo, soluciones isotónicas y soluciones amortiguadoras.	11
B. - METODOS.	
1. - Mutagénesis con NG y enriquecimiento en bacterias negativas para el transporte de potasio, por reciclaje con penicilina.	15
2. - Medición del Hinchamiento celular.	
a) En protoplastos de la cepa silvestre.	17
b) En células completas.	17
3. - Preparación de inóculos.	18

4. - Cinéticas de crecimiento bacteriano. 19
5. - Efecto del lavado con 2,4 dinitrofenol en el Hinchamiento celular. 19

#### IV. - RESULTADOS.

1. - Mutagénesis y selección de mutantes alteradas en el transporte de potasio. 21
2. - Crecimiento en medio sólido. 22
3. - Cinéticas de crecimiento de los cultivos en medio líquido. 22
4. - Hinchamiento celular.
- a) En protoplastos y en células completas de la cepa silvestre. 25
- b) En la cepa mutante SM-13. 25
- c) En células completas a diferentes concentraciones de potasio. 26
- d) En células completas con metoxiglucosa. 26
- e) En células completas en diferentes fuentes de -- carbono. 27
5. - Efecto del 2,4 dinitrofenol en el hinchamiento celular. 27

#### V. - DISCUSION.

#### VI. - CONCLUSIONES.

#### VII. - BIBLIOGRAFIA.

## Abreviaturas utilizadas.

DNP	2,4 dinitrofenol
DNA	Acido desoxirribonucleico.
D.O.	Densidad óptica
Fru.	Fructosa.
Glu.	Glucosa.
<u>kdp</u>	Sistema inducible de transporte de potasio en <u>Escherichia coli</u> ( constituye un operón ).
<u>kdp A</u>	Gen que codifica para una proteina citoplásmica de -- 47 000 daltones.
<u>kdp B</u>	Gen que codifica para una proteina citoplásmica de -- 90 000 daltones.
<u>kdp C</u>	Gen que codifica para una proteina citoplásmica de -- 22 000 daltones.
<u>kdp D</u>	Gen que codifica para una proteina unida a membrana - de 90 000 daltones que actúa como un regulador positi- vo del sistema <u>kdp</u>
NG	N-Metil-N' nitro N-nitroso guanidina ( también nitro- soguanidina.
Sac.	Sacarosa
SSF	Solución salina fisiológica.
<u>trk A</u>	Sistema constitutivo de transporte de potasio en -

Escherichia coli ( constituye un regulón ).

trk A-E

Conjunto de genes no unidos entre sí que constituyen el sistema trk A.

trk F

Sistema de transporte de potasio presente en ausencia de kdp y trk A.

## Indice de Figuras

- Fig. 1. Cinética de crecimiento de S. typhimurium SM-13 en glucosa al 0.4% y diferentes concentraciones de potasio.
- Fig. 2. Cinéticas de crecimiento de S. typhimurium LT-2 y SM-13 en glucosa al 0.4% variando la concentración de potasio del medio de cultivo.
- Fig. 3. Hinchamiento celular en protoplastos y células completas de S. typhimurium LT-2.
- Fig. 4. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 en alta y baja concentración de potasio.
- Fig. 5. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 en diferentes concentraciones de potasio.
- Fig. 6. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 con metoxiglucosa.
- Fig. 7. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 en diferentes fuentes de carbono.
- Fig. 8. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 a bajas concentraciones de potasio utilizando 2,4 dinitrofenol ( 10 mM ).

## RESUMEN:

El hinchamiento celular ha sido descrito en protoplastos y en células completas de algunas especies bacterianas. Se ha reportado como un fenómeno dependiente de glicólisis y de la concentración de potasio, reversible en protoplastos, que puede ser medido por el cambio de turbidez del cultivo y por el aumento del volumen celular.

En Salmonella typhimurium hemos encontrado que se presenta el hinchamiento celular en protoplastos y en células completas. En las células se presentó en los primeros minutos posteriores a la adición de una mezcla de sacarosa-glucosa, fué parcialmente reversible y se mantuvo durante una hora. En protoplastos el fenómeno fué similar, parcialmente reversible pero la recuperación fué más lenta y se presentó lisis celular.

Al igual que para otras especies, el hinchamiento varió de acuerdo a la concentración de potasio adicionado.

Con el objeto de relacionar este efecto de hinchamiento y contracción celular con la acumulación de potasio, hemos aislado mutantes con posibles alteraciones a nivel de transporte de este ión, las cuales son incapaces de crecer en concentraciones por debajo de 20  $\mu\text{M}$  de potasio.

A la fecha no se tiene ningún reporte en la literatura en



el cual se haya comprobado la capacidad de hinchamiento en células de Salmonella typhimurium ; por lo que en nuestro laboratorio nos hemos interesado en estudiar la posible ocurrencia de este evento, así como el tratar de establecer el papel de algunas proteínas de tipo contráctil en ésta bacteria y su relación con el hinchamiento celular.

Nuestros estudios nos han permitido establecer que en nuestro modelo de trabajo el hinchamiento ocurre cuando en el medio de -- ensayo se encuentran presentes glucosa (o algún intermediario de la vía glicolítica ) sacarosa y potasio.

## INTRODUCCION:

Abrams (1958) encontró que al tratar con lisozima las células completas de Streptococcus faecalis estas eran susceptibles a perder su pared celular (protoplastos). Subsecuentes investigaciones le permitieron observar que al preparar protoplastos de estos organismos era necesario a su vez el uso de una alta concentración de sacarosa, la cual actuaba como sustancia impermeable necesaria para la estabilización osmótica; tales investigaciones le llevaron a encontrar que al adicionar pequeñas cantidades de glucosa a la suspensión de protoplastos se producía un hinchamiento reversible --- (hinchamiento metabólico reversible) indicado por una caída progresiva en la turbidez, la cual revertía espontáneamente regresando lentamente a su valor inicial, esto probablemente debido a que el número de protoplastos se mantenía constante.

Este fenómeno fisiológico que ocurría en la células bacterianas se pensó que dependía de glicólisis, ya que durante la fase de hinchamiento, la turbidez del cultivo disminuyó paralelamente a la desaparición de la glucosa y la fase de reversión se inició, según Abrams (1959) al agotarse la glucosa por completo. Esto indicaba que ambos eventos (hinchamiento-contracción) eran subsecuentes a la conversión de glucosa a ácido láctico.

La duración del hinchamiento fué proporcional a la concentra-

ción de glucosa pues se encontró que cuando la concentración de glucosa se mantenía por arriba de 0.04 M el hinchamiento era irreversible lo que traía como consecuencia la lisis metabólica (esto se estableció por la aparición de fantasmas celulares y la elevada concentración de sustancias intracelulares que absorbía en el ultravioleta a 220 nm).

Si bien dicho fenómeno fué dependiente de glicólisis también requirió de un adecuado suplemento de potasio para que se llevara a cabo; de ahí que las condiciones óptimas para dicho evento fueron las adiciones de sacarosa glucosa y potasio.

Se sugirió el siguiente postulado para explicar este fenómeno (Abrams 1959):

Los protoplastos inicialmente en equilibrio osmótico con el medio fueron impermeables a la elevada concentración de sacarosa y la adición de glucosa y de potasio favorecieron un cambio de permeabilidad de la membrana, permitiendo así la entrada isoosmótica del azúcar impermeable en dirección de un gradiente de concentración; esto originó el hinchamiento de la célula y por tanto se presentó un cambio en el índice de refracción que se detectó por la caída de la densidad óptica; la membrana permaneció permeable hasta que se agotó la glucosa, de ahí que un exceso de glucosa trajo como consecuencia su lisis; cuando la concentración de glucosa se agotó se originó la reversión de la membrana a su estado impermeable.

ble inicial.

Minkoff y Damadian (1976) encontraron también que este fenómeno ocurrió como una reacción concomitante a la acumulación de potasio por la célula, así mismo se sabe que las bacterias concentran potasio del medio ambiente y en el caso de Escherichia coli la concentración intracelular está casi al mismo nivel que en células de mamífero; se sabe que cuando las células se suspenden en un medio bajo en potasio la diferencia entre el potasio intra y el extracelular puede exceder de 1000 (Lubin y Kessel 1960).

Minkoff y Damadian (1976) demostraron que durante la captación de 85 mmoles de potasio por litro de agua celular el volumen de la célula se incrementó en un 12%.

En otros estudios, se encontró que la cepa silvestre de E. coli K-12 presentó el hinchamiento durante la captación de potasio; pero no lo presentó una cepa mutante deficiente en la captación de potasio obtenida por inducción con nitrosoguanidina, que al perder su selectividad a cationes alcalinos perdió también su capacidad de hinchamiento. En la mutante el hinchamiento ocurrió lentamente a bajas concentraciones del ión y rápidamente en altas concentraciones del mismo lo que demostró que en esta cepa el "swelling" particulado o hinchamiento celular fué dependiente de la concentración de potasio (Lubin y Kessel 1960, Minkoff y Damadian 1976). También se han obtenido con luz ultravioleta cepas de

ficientes en la liberación de este ión (Damadian 1968).

El fenómeno de hinchamiento de células intactas de E.coli K-12 fué también un evento reversible evidente por el retorno de la densidad óptica a su valor inicial en un período de 30 a 40 minutos y a este evento se le refirió como un ciclo de hinchamiento-con---tracción (Minkoff y Damadian 1976).

En trabajos realizados en E.coli (Epstein y Laimins 1980) se ha podido establecer que esta bacteria utiliza el ión potasio principalmente con dos finalidades:

- 1.- Regular su osmolaridad intracelular.
- 2.- Activar enzimas intracelulares.

Por su pared rígida, la bacteria mantiene una osmolaridad más alta dentro de ella que la existente afuera. La diferencia entre las presiones osmóticas interna y externa es conocida como presión de turgencia, la cual se requiere para el crecimiento y división celular. E.coli para mantener la presión fisiológica de 3 atm. requiere de gran cantidad de potasio (Epstein y Laimins 1980).

En las células la concentración de potasio se mide por la osmolaridad del medio y puede fluctuar de 0.15 M en medios muy diluidos hasta 0.6 M en medios con 1200 mosM (Epstein y Schults 1965). Una concentración de potasio de 0.1 M parece ser suficiente para activar enzimas intracelulares, por lo que el papel del potasio en las condiciones arriba mencionadas satisface este requerimiento.

Solo alrededor de 88 de los 1027 genes conocidos de E. coli tienen relación con el metabolismo y 77 de estos 1027 están relacionados al transporte de pequeñas moléculas. Se estima que unos 150 genes están relacionados al transporte de aniones y cationes y que existen por lo menos dos sistemas de transporte por ión con cuatro genes por sistema ( Bachman 1983 ).

E. coli para regular su osmolaridad tiene la información de aproximadamente 10 genes que aseguran la acumulación de potasio ( Epstein y Davis 1971); estos genes se han podido identificar al aislar y seleccionar mutantes que requieren elevadas concentraciones de potasio para crecer. Al analizar tales mutantes se han podido detectar dos tipos de sistemas de transporte de potasio llamados kdp y trkA (Rhoads D, Waters B, Epstein W, 1976; - Rosen P. Barry 1978).

El sistema kdp generalmente no se expresa en células que crecen en medios con potasio; es el típico sistema bacteriano - constituido por cuatro genes que se agrupan y regulan coordinadamente . Presenta alta afinidad al ión potasio .

El gen kdp D codifica para un regulador positivo y kdp A , kdp B y kdp C son los genes estructurales del operón (Epstein W Davis 1970, Laimins y Epstein , Altendork y Rhoads 1978). Se ha logrado integrar el fago lambda en los cuatro genes estructurales y se ha encontrado que este operón se lee de A a C y que D se encuentra al final del operador como una unidad transcripcional separada que cuando se altera por mutación , la expresión de los genes kdp se vuelve parcialmente constitutiva (Epstein, --- Rhoads, Laimins 1978).

Se han aislado fagos de transducción generalizada que han permitido identificar los productos del operón como proteínas de

membrana con pesos moleculares de 47 000 , 90 000 y 22 000 daltones respectivamente (Laimins , Rhoads, Altendork y Epstein 1978) y se han identificado electroforéticamente al separar proteínas de membrana interna.

La complementación intracistrónica entre algunas mutaciones kdp indicó que el producto del kdp D es una proteína de 90 000 - daltones unida a membrana , que actúa como un regulador positivo; se cree que es el sensor de la presión de turgencia y que recibe dicha presión a través de la membrana (Epstein, Laimins, Rhoads 1981) . La presión de turgencia juega un papel importante al regular la función de las proteínas del sistema kdp. En E.coli cuando la presión de turgencia se reduce por un aumento en la osmolaridad del medio, los sistemas de transporte de potasio responden aumentando la captación neta de este ión . Se cree que este es el primer evento en la osmoregulación de bacterias como E.coli en que - el aumento de potasio acumulado incrementa la osmolaridad interna y restaura la presión de turgencia(Epstein, Laimins, Rhoads 1981). El operón kdp es un sistema reprimible , además presenta una ATPasa estimulada por potasio(Epstein, Whitelaw,Hessé 1978) es dependiente de ATP e independiente de la fuerza motriz de protones (Mitchel 1961).

Se han aislado otras mutantes deficientes en su capacidad de transportar potasio contra un gradiente de concentración; estas mutantes obtenidas por el método de selección con penicilina de Lubin

(1962) además tenían alterada su capacidad para sintetizar metionina (Damadian y Solomons 1964).

El sistema trK A es de baja afinidad a potasio pero con un alto grado de transporte, por lo tanto se abastece la reserva de potasio en minutos; es el principal sistema en la cepa silvestre y es constitutivo. Es genéticamente complejo pues consta de seis genes trK A, trK B, trK C, trK D, trK E y trK G no unidos entre sí; cualquier mutación en los genes A y E reduce la actividad del sistema (Epstein W, Laimins L. 1980).

Se pensaba en la existencia de un tercer sistema de transporte conocido como trK F pero algunos estudios sugieren que todas las mutaciones trK forman parte de un sistema único el trK A que requiere tanto de ATP como de fuerza motriz de protones para acumular potasio activamente (Rhoads, Epstein 1977). En cuanto a la regulación del sistema trK A los productos de los genes trK A y trK D se regulan por ATP y en ausencia de tal regulación solo es retenida una baja proporción del potasio transportado.

Se sabe que la actina es una de las principales proteínas en las células eucarióticas y se ha podido establecer su papel en el aparato contráctil de músculo así como en motilidad, citoquinesis, adhesión, fagocitosis y forma celular (Huxley 1969, Korn 1978).

La detección de una proteína similar a actina en E. coli -- actin-like (A-L) (Minkoff y Damadian 1976) sugiere que ésta es -- una molécula ancestral que tuvo su origen en los procariotes, los



autores sugieren que esta fracción ( A-L ) puede participar en -- el hinchamiento que regula el transporte de sodio-potasio a través de la membrana citoplásmica.

Esta fracción A-L sufre agregación reversible en las mismas condiciones en que actina se polimeriza y depende de potasio para dicha polimerización. La fracción A-L de la cepa silvestre de --- E.coli fué comparada con la misma fracción de una mutante de trans porte de potasio y se encontró en esta última que la A-L no sufre polimerización, mientras que en la cepa silvestre esto si ocurre (Damadian 1968).

## II.- OBJETIVOS:

El objetivo general de esta investigación fué analizar el efecto de hinchamiento celular en Salmonella typhimurium LT-2 y su relación con el ión potasio.

Para tal estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Obtener mutantes de Salmonella typhimurium LT-2 con posibles alteraciones en el transporte del ión potasio, utilizando nitro\_soguanidina como agente mutágeno y seleccionar las mutantes por el método de penicilina.
- b) Caracterizar cinéticamente el crecimiento de una de las mutantes obtenidas y su dependencia de potasio, en comparación con la cepa silvestre.
- c) Medir el hinchamiento celular y su dependencia de glicólisis y de la concentración de potasio en ambas cepas.

## III.- MATERIALES Y METODOS

## A.- Materiales.

1.- Cepas de Salmonella typhimurium.

LT-2 Probable fenotipo  $kdp^+$ ,  $trk^+$ ; protótrofa, obtenida de la colección del difunto Dr. M. Demerec.

SM-13 No crece a bajas concentraciones de potasio; obtenida a partir de LT-2 por tratamiento mutagénico con NG y selección con penicilina.

## 2.- Conservación de las cepas bacterianas.

Las cepas utilizadas en este trabajo se conservaron a 4°C en tubo con tapón de rosca, con el medio inclinado que contenía Davis normal, agar y casaminoácidos. Se resembraron en el mismo medio y se checkaron periódicamente en agar S-S para facilitar su manipulación.

## 3.- Reactivos químicos.

Nitrosoguanidina de K y K laboratories Inc. Plainview N. Y. EUA.

Dextrosa, sacarosa, fructosa, trisma base grado amortiguador y -- reactivo, sulfato de amonio y lisozima fueron de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. EUA.

Sulfato de magnesio, cloruro de potasio y 2,4 dinitrofenol fueron de Merck. Darmstadt. Rep. Fed. de Alemania.

Los fosfatos mono y dipotásicos y mono y disódicos, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, alcohol etílico, acetato de sodio, citrato de sodio, glicerol, metoxiglucosa, cloruro de potasio fueron de J.T. Baker. Xalostoc, México.

Extracto de levaduras y casaminoácidos fueron de casa Difco, Michigan EUA.

Agar S-S, agar bacteriológico, Dextrosa y peptona de caseína fueron de Bioxon de México.

Penicilina G-sódica fué de laboratorios farmacéuticos Lakeside.

#### 4.- Medios de cultivo, soluciones isotónicas y soluciones amortiguadoras.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 15 lbs/plg<sup>2</sup> de presión de vapor (121°C) por 15 min.

La penicilina se esterilizó por filtración y se preparó en el momento de usarse.

Las fuentes de carbono se prepararon en solución aparte del

medio de cultivo y se esterilizaron en autoclave adicionándose al final en concentraciones al 0.4% (p/v). Cuando se requirió de medios sólidos se adicionó agar al 1.5% (p/v).

Para este trabajo se emplearon varios medios de cultivo cuya composición es la siguiente:

Davis normal	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3.0 gr., $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 7.0 gr., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gr., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 gr.; agua destilada 1000 ml y pH 7.0 (contiene aproximadamente 23 mM de potasio (Davis y Mingioli 1950)).
Tris Na	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 3.0 gr., trisma base 6.78 gr., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gr., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.04 gr., agua bidestilada a 1000 ml y pH 7.0 (contiene aproximadamente 5 uM de potasio). A este medio se le adicionó KCl para ajustar a concentraciones de potasio de 5 a 1000 uM)
Tris K	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3.0 gr, trisma base 6.78 gr., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gr., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 gr.; agua destilada a 1000 ml y pH 7.0 (contiene aproximadamente 10 mM de potasio).
Medio mínimo	El Davis normal o tris Na con la fuente de carbono al 0.4%.

- Medio rico Davis N, glucosa y agar en las concentraciones al 0.4% y 1.5% respectivamente y - 0.2% de casaminoácidos y extractos de levadura.
- Medio para evaluar el hinchamiento celular. Sacarosa 0.4 M; glucosa 0.01 M o 0.02 M (u otras fuentes de carbono a la concentración de 0.02 M)  $K_2HPO_4$  2 mM y pH 7.2. Cuando se midió el hinchamiento celular - a diferentes concentraciones de potasio se hizo un tris Na de 20 a 1000  $\mu$ M de potasio.
- Medio para cinética de crecimiento. Se utilizaron tres medios que difieren en la concentración de potasio; Davis normal, tris Na (ajustando con una solución patrón de KCl la diferentes concentraciones de potasio que se trabajan) y Tris K; en todos con la fuente de carbono que se especifique.
- Medio para pre-inóculo. Davis normal casaminoácidos al 0.2% (p/v) o el medio mínimo especificando la fuente de carbono.

- Medio para  
reciclaje con  
penicilina.
- Casaminoácidos al 0.04%; tris Na adicionando KCl para ajustar a 20 uM de potasio, glucosa 0.4% y penicilina 1000 U/ml (volumen final de 50 ml) en agua bidestilada.
- Regulador de  
fosfatos.
- $K_2HPO_4$  13.2 g; se disuelven en 1000 ml de agua destilada, se ajusta con HCl a pH 7.2 ( contiene aproximadamente 2 mM de potasio)
- Regulador de  
acetato de  
sodio.
- Se prepara una solución de acetato de sodio en concentración 0.2M y pH 5.0 y se esteriliza en autoclave.
- Solución salina  
fisiológica.
- NaCl al 0.85% ( p/v), se distribuye en porciones de 100 ml y se esteriliza en autoclave.
- 2,4 DNP.
- Solución de 2,4 dinitrofenol en concentración 10 mM en agua destilada y se conserva en frasco color ámbar.

## B.- Métodos.

- 1.- Mutagénesis con NG y enriquecimiento en bacterias negativas para el transporte de potasio, por reciclaje con penicilina.

La cepa silvestre se creció en un medio rico durante 16 horas a 37°C , la suspensión celular se cosechó por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos.

Las células se resuspendieron en 0.5 ml de acetato de sodio 0.2M estéril con pH 5.0 y se adicionó el agente mutágeno en concentración de 100 microgramos/ ml como lo reporta Adelberg et al ( 1965) . El paquete celular se incubó por 3.5 horas a 37°C sin agitación ; transcurrido este tiempo se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 0.6 ml de SSF ; 0.3 ml de esta suspensión se adicionaron a 9.7 ml de medio rico dejándose en agitación durante toda la noche para su recuperación . Se volvieron a centrifugar, se lavaron con SSF dos veces y se resuspendieron en el medio para reciclaje con penicilina (Lubin M 1962 ; Kaufman H. Gorini L. 1960).modificado por nosotros. Se agitaron a 37°C por dos horas ; se centrifugaron y resuspendieron en medio rico por cinco horas para su recuperación. Se cosecharon y resuspendieron nuevamente en el medio con penicilina. Este tratamiento se repitió dos veces más y después del -



cuarto reciclaje con penicilina las células se cosecharon, se lavaron con solución salina y se prepararon diluciones hasta tener aproximadamente  $10^3$  células/ml. A partir de dicha dilución se sembró por espatulado en medio sólido mínimo (Davis normal).

Las posibles mutantes de transporte de potasio se aislaron de las cajas espatuladas tomándose cada colonia con un palillo estéril y se sembraron por picadura en el medio mínimo mencionado anteriormente; se incubaron las cajas por 24-48 horas y se procesaron por la técnica de réplica en placa (Lederberg y Lederberg 1952) en tres medios de composición diferente que fueron :

- a) Medio rico.
- b) Medio mínimo con glucosa utilizando Davis N.
- c) Medio mínimo con glucosa utilizando tris Na ajustando a 20  $\mu$ M de potasio con KCl.

Las colonias obtenidas de la réplica en placa se seleccionaron empleando criterios de su crecimiento en los tres medio, eligiéndose predominantemente aquellas cuyo crecimiento era casi nulo en tris Na y abundante en Davis N; estas clonas se volvieron a aislar y replicar en idénticas condiciones encontrándose por segunda vez las mismas características de crecimiento.

## 2.- Medición del hinchamiento celular.

a) En protoplastos de la cepa silvestre.

Para probar la existencia del efecto de hinchamiento celular en Salmonella typhimurium se preparó a partir de la cepa -- silvestre una suspensión de protoplastos ( células sin pared) de acuerdo a la técnica de Abrams ( 1959). Para ello el paquete celular obtenido de un crecimiento de 18 horas de incubación en medio rico se lavó y resuspendió en 5 volúmenes de regulador de fosfatos pH 7.2 ( 2mM de potasio ), se adicionó sacarosa 0.4M - se agregó lisozima cristalina en una concentración final de 180 ug/ml y se incubó a 37°C por 100 minutos. La suspensión se centrifugó y los protoplastos se resuspendieron ahora en regulador de fosfatos con sacarosa ; se inocularon entonces matraces nefelométricos ajustando a 0.8 unidades de absorbancia y finalmente se adicionó glucosa en concentración de 0.02 M y se incubó en agitación a 37°C realizándose lecturas a 660 nm a intervalos -- de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 minutos.

b).- En células completas.

Para analizar el hinchamiento en células completas de la -- cepa silvestre se inoculó ésta en medio rico dejándose crecer -- por 18 horas; transcurrido este tiempo las células se cosecharon por centrifugación y el paquete celular se lavó tres veces con SSF y una con regulador de fosfatos. En matraces nefelomé--

tricos previamente estériles se colocaron 50 ml del regulador - sacarosa 0.4 M y se adicionó un inóculo de células hasta ajustar a una densidad óptica de 0.8. Finalmente se adicionó glucosa en concentración 0.02 M en un volumen final de 60 ml y se -- leyó a 660 nm; se incubaron los matraces y se hicieron lecturas a los intervalos de tiempo mencionados en el punto a).

En todos los experimentos se colocaron 2 matraces control, uno conteniendo glucosa 0.02 M y regulador de fosfatos (sin sacarosa) y otro conteniendo sacarosa 0.4 M y regulador de fosfatos (sin glucosa).

En la cepa SM-13 el ensayo se efectuó en las mismas condiciones que para la cepa silvestre.

El ensayo también se hizo sustituyendo la glucosa por -- metoxiglucosa, acetato, citrato, glicerol y fructuosa a la misma concentración para ambas cepas (0.02 M) y con glucosa a diferentes concentraciones de potasio (20 a 23 000 micromolar).

Los controles en todos los casos fueron como en el experimento con glucosa y además se adicionó un control positivo con este carbohidrato.

### 3.- Preparación de inóculos.

En la mayoría de los casos las células se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación para tener un buen inóculo.

Para cinéticas de crecimiento los inóculos se prepararon en medio Davis N. con casaminoácidos, pero en ciertos experimentos se varió la fuente de carbono según se especifica. Las células se cosecharon por centrifugación a 4°C en una centrífuga Sorvall (rotor GSA) a 2600 x g durante 15 min.; se lavaron y resuspendieron en SSF antes de usarse.

#### 4.- Cinéticas de crecimiento bacteriano.

Las condiciones que se utilizaron para las cinéticas de crecimiento son las indicadas por Parada y Ortega (1967) preparando las células de acuerdo al experimento a realizar:

Las células lavadas se distribuyeron en matraces nefelométricos Bellco de 300 ml equipados con tubo lateral de 19 mm de diámetro con 50 ml de medio de cultivo, ajustando la lectural inicial a 0.08 unidades de absorbancia. 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 mediante la densidad óptica de los cultivos a 660 nm usando -- para ello un espectrofotómetro marca Coleman modelo Junior.

#### 5.- Efecto del lavado con 2,4 dinitrofenol en el hinchamiento celular.

Para estimular la captación neta de potasio por las célu-

las estas deben ser sometidas a un tratamiento por medio del --  
cual el potasio intracelular sea eliminado por completo; esto -  
puede efectuarse por medio de shock osmótico o por un tratamienu  
to con 2,4 dinitrofenol el cual extrae alrededor del 90% del pou  
tasio celular en los primeros minutos ( Davis et al 1976) .

Con objeto de tener células libres de potasio intracelular  
se trataron con DNP 10 mM para lo cual el cultivo en fase expo-  
nencial se cosechó por centrifugación y se resuspendió en DNP  
por 5 min; las células se lavaron 3 veces con SSF para eliminar  
el compuesto lo mejor posible y entonces se resuspendieron en --  
matraces nefelométricos conteniendo regulador de fosfatos y sacau  
rosa , se ajustaron a 0.8 unidades de absorbancia, se adicionó -  
glucosa y se determinó el hinchamiento celular a los diferentes  
tiempos ya establecidos . En esta ocasión se probaron concentra-  
ciones de potasio por abajo de 20 micromolar tanto para la cepa  
silvestre como para la mutante.

## IV. RESULTADOS.

1.- Mutagénesis y selección de mutantes alteradas en el transporte de potasio por reciclaje con penicilina.

Para la mutagénesis se empleó el agente alquilante nitrosoguanidina el cual actúa a nivel de la horquilla de replicación -- produciendo mutaciones puntuales en las bases expuestas de las -- cadenas que habrán de replicarse; por lo tanto su acción es específica del sitio y momento de duplicación del genoma bacteriano. ( Cerdá - Olmedo , Hanawalt y Guerola 1968 , Bolstein y Jones -- 1969 ) .

La nitrosoguanidina hasta hace algunos años se le consideraba como el mutágeno químico más potente debido a que es capaz de producir gran número de alquilaciones que originan mutaciones letales ( Lee , Gold Mirvish 1977 ). Esta característica ha favorecido que se hayan localizado nuevas lesiones cromosómicas (te---niendo otras marcas de referencia) pues es posible mediante un - solo tratamiento obtener mutantes vicinales dañadas en dos o más genes. La cepa SM-13 fué obtenida mediante un solo tratamiento -- mutagénico con nitrosoguanidina. Con el sistema de selección de - mutantes por el método de reciclaje con penicilina se obtuvieron aproximadamente 50 colonias por caja ( se prepararon 60 cajas ) - a las 72 horas de incubación.

Dichas colonias se aislaron y seleccionaron por la técnica de réplica en placa y se encontró que solo unas 20 colonias presentaron un crecimiento óptimo en un medio con alta concentración de potasio pero su crecimiento en baja concentración del mismo era muy escaso; por tal motivo dichas colonias se aislaron y replicaron nuevamente en alta y baja concentración de potasio y se encontró que solo 7 colonias seguían manteniendo la característica de crecer lentamente en baja concentración de potasio para lo cual se caracterizaron por cinética de crecimiento en medio líquido .

## 2.- Crecimiento en medio sólido.

Cuando las mutantes aisladas por el método de selección con penicilina se cultivaron en cajas utilizando como fuente de carbono y energía a la glucosa, las colonias inoculadas en una concentración de potasio aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  fueron visibles a las 72 horas de incubación aunque su crecimiento en medio rico y en medio Davis N fué rápido observándose las colonias a las 24 horas de incubación al igual que la cepa silvestre que se empleó como control de crecimiento en estos medios de cultivo.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó para los subsecuentes experimentos la clona que mostró más estabilidad en cuanto a su incapacidad de crecimiento en medio con baja concen-

tración de potasio a la cual denominamos SM-13 .

3.- Cinéticas de crecimiento de los cultivos en medio líquido, y de SM-13 en diferentes concentraciones de potasio.

En la figura 1 se presenta la cinética de crecimiento de la cepa SM-13 que, como se dijo, parece presentar problemas en su capacidad de transportar el ión potasio, para lo cual se probaron diferentes concentraciones del ión en el medio de cultivo que van desde 0.005 mM hasta 23 mM ; esto fué con la finalidad de determinar en que rango de concentración dicha cepa es capaz de crecer.

Nótese que en concentraciones de 0.020 mM el crecimiento es nulo y conforme se incrementa la concentración de potasio la velocidad de crecimiento aumenta también.

Con el fin de determinar si el crecimiento de esta cepa no es favorecido por la presencia de cloruros en vez de potasio( por el KCl adicionado ) se colocó un matraz control en el cual se sustituyó KCl por NaCl y puede observarse que el crecimiento es completamente nulo, lo cual nos indica que se requiere de la presencia de potasio en el medio de cultivo para que la cepa crezca.

El medio Davis N sin citrato ( Davis y Mingioli 1950) es aproximadamente 23 mM de potasio y es utilizado comúnmente como fuente de sales minerales para el cultivo de Salmonella typhimu-



num ; por tal motivo dicha concentración es óptima para el crecimiento por lo cual quisimos probar medios con concentraciones bajas e intermedias del ión y para tal efecto se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento probándose tres concentraciones diferentes.

En la figura 2 se presenta la cinética de crecimiento de la cepa silvestre ( LT-2 ) y la cepa mutante SM-13. Nótese que el crecimiento de la cepa silvestre es similar en las tres concentraciones. En la misma gráfica encontramos que la cepa SM-13 a -- bajas concentraciones del ión ( 0.020 mM ) presenta un crecimiento escaso y conforme se incrementa la concentración de potasio se observa una mejoría considerable.

Cabe mencionar que el matraz con la cepa SM-13 que contenía potasio en baja concentración, antes de la tercera hora de incubación no presenta indicios de desarrollo, por lo tanto se dividió su contenido y a un matraz se le adicionó un pulso de KCl -- mientras que la fracción restante se mantuvo intacta.

Puede observarse en la gráfica que transcurridas tres horas de incubación el matraz al que se adicionó KCl comienza a desarrollar su crecimiento en forma notable mientras que la segunda fracción de dicha concentración se mantiene sin crecer hasta finalizar las 8 horas de duración de la cinética.

a) En protoplastos y en células completas de la cepa silvestre.

Cuando los protoplastos de la cepa silvestre se sometieron al procedimiento establecido por Abrams para evaluar el efecto de hinchamiento se observó que en el transcurso de los primeros 10 min. se presentaba una muy brusca caída en la densidad óptica del cultivo, esta baja se mantuvo aproximadamente 10 min. más y transcurrido este lapso la absorbancia comenzó a incrementarse; en protoplastos el efecto de hinchamiento y recuperación ocurrió aproximadamente en 90 min. aunque la gráfica que se muestra es hasta los 60 min.

En células completas de la cepa silvestre LT-2 se encontró el mismo comportamiento que en protoplastos, con excepción de que en este caso la recuperación se presentó en forma parcial, es decir, la densidad óptica no retornó a su valor inicial. Estos resultados contrastan con los obtenidos por los tres controles que se siguieron. Los resultados del hinchamiento para protoplastos y células completas de la cepa silvestre se muestran en la figura 3.

b) En la cepa mutante SM-13.

En la mutante que no creció en las bajas concentraciones de potasio encontramos que a una concentración de 20 micromolar fué

incapaz de presentar hinchamiento mientras que a 2000 micromolar el hinchamiento ocurrió presentando un comportamiento similar al de la cepa LT-2 con recuperación parcial a los 60 min. de incubación. En la figura 4 mostramos el hinchamiento celular para esta cepa en comparación con la cepa silvestre.

c) En células completas a diferentes concentraciones de potasio.

Una vez que comprobamos que *S. typhimurium* es capaz de presentar hinchamiento celular quisimos conocer en que rango de concentración de potasio tanto la cepa LT-2 como la SM-13 tenían la posibilidad de presentarlo para lo cual trabajamos un rango de concentraciones de potasio que va desde 20 hasta 23 000 micromolar.

En la figura 5 se muestran las gráficas representativas de cada concentración y puede verse que la cepa silvestre presenta hinchamiento aún en las concentraciones más bajas. Por su parte la cepa mutante se sometió al mismo tratamiento a diferentes concentraciones y puede verse que en un rango de 20 a 100 micromolar no ocurrió el efecto y conforme se incrementó la concentración del ión el evento se favoreció notablemente (250, 500, 1000, 2000 10 000, 23 000 micromolar).

d) En células completas con metoxiglucosa.

Con objeto de determinar si el hinchamiento celular depende directamente del metabolismo de glucosa probamos un análogo de esta (metoxiglucosa) el cual es introducido a la célula pero no es utilizado por ella; en la figura 6 podemos ver que tanto en la cepa LT-2 como en la mutante SM-13 con la substitución por metoxi glucosa el evento no ocurrió tal y como se presentó en el matraz con glucosa donde los primero 10 min. se observó la caída de turbidez del cultivo.

e) En células completas en diferentes fuentes de carbono.

Una vez que se probó que el hinchamiento es un evento dependiente de la presencia de glucosa en el medio probamos otras fuentes de carbono con el fin de conocer el efecto de estos compuestos en el hinchamiento (algunos intermediarios de glicólisis y otros de ciclo de Krebs).

Aparentemente en ambas cepas el hinchamiento fué más marcado cuando se usaron intermediarios de glicólisis como fuente de carbono (fig :7) .

5.4 Efecto de 2,4 dinitrofenol en el hinchamiento celular.

Si bien se esperaba que después del tratamiento con 2,4 DNP las células tuvieran una respuesta más marcada con respecto a su acumulación del ión potasio pudimos observar que tanto la cepa --

silvestre como la mutante no presentan ningún efecto en cuanto a ser vaciadas de potasio intracelular, por el contrario parece ser que el tratamiento con este agente pudo afectar su viabilidad, -- pues al someter las células al hinchamiento celular estas no presentan ninguna respuesta ( Fig. 8 ).

Fig. 1. Cinética de crecimiento de *S. typhimurium* SM-13 en glucosa al 0.4% y diferentes -- concentraciones de potasio.

- Tris Na ( 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- ▲ Tris Na ( 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Tris Na ( 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Tris Na ( 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Tris Na ( 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Tris Na ( 1250  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Tris  $\text{K}^+$  ( 10 000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- △ Tris Na ( 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  + 1500  $\mu\text{M}$  de Na como NaCl ).

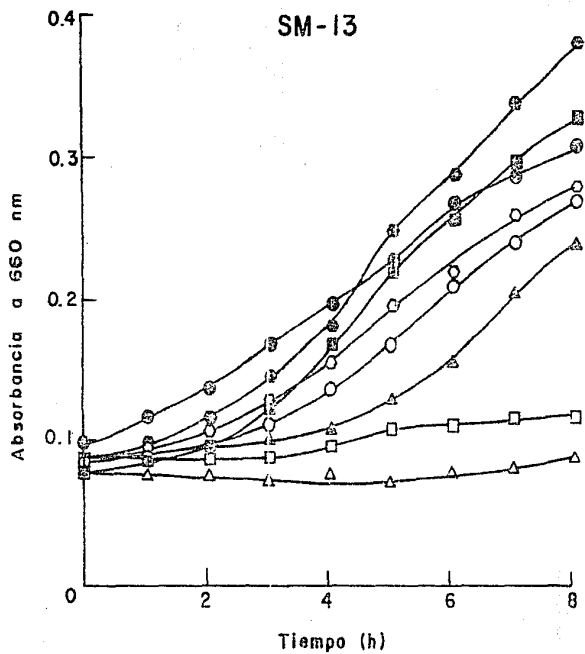


Fig. 2. Cinética de crecimiento de *S. typhimurium* LT-2 y SM-13 en glucosa al 0.4% y variando la concentración de potasio del medio de cultivo.

- Tris Na ( 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- ▲ Tris  $\text{K}^+$  ( 10 000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Davis N ( 23 000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- ◆ Adición de KCl a la tercera hora de incubación ( 2 000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  de concentración final ).



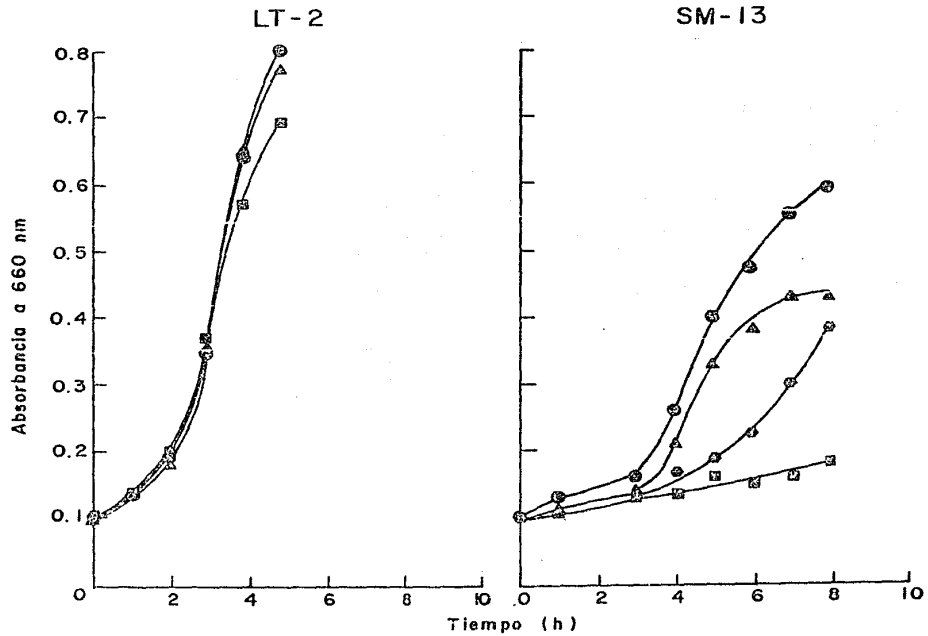


Fig. 3. Hinchamiento celular en protoplastos  
y células completas de S.typhimurium  
LT-2.

- Blanco ( regulador de fosfatos 2 000  $\mu\text{M}$  de  $\text{K}^+$  )
- Control sin sacarosa ( con glucosa 0.02 M )
- △ Control sin glucosa ( con sacarosa 0.4 M )
- Glucosa 0.01M y sacarosa 0.4M +  $\text{K}^+$  (2 000  $\mu\text{M}$  )
- Glucosa 0.02M y sacarosa 0.4M +  $\text{K}^+$  (2 000  $\mu\text{M}$  )

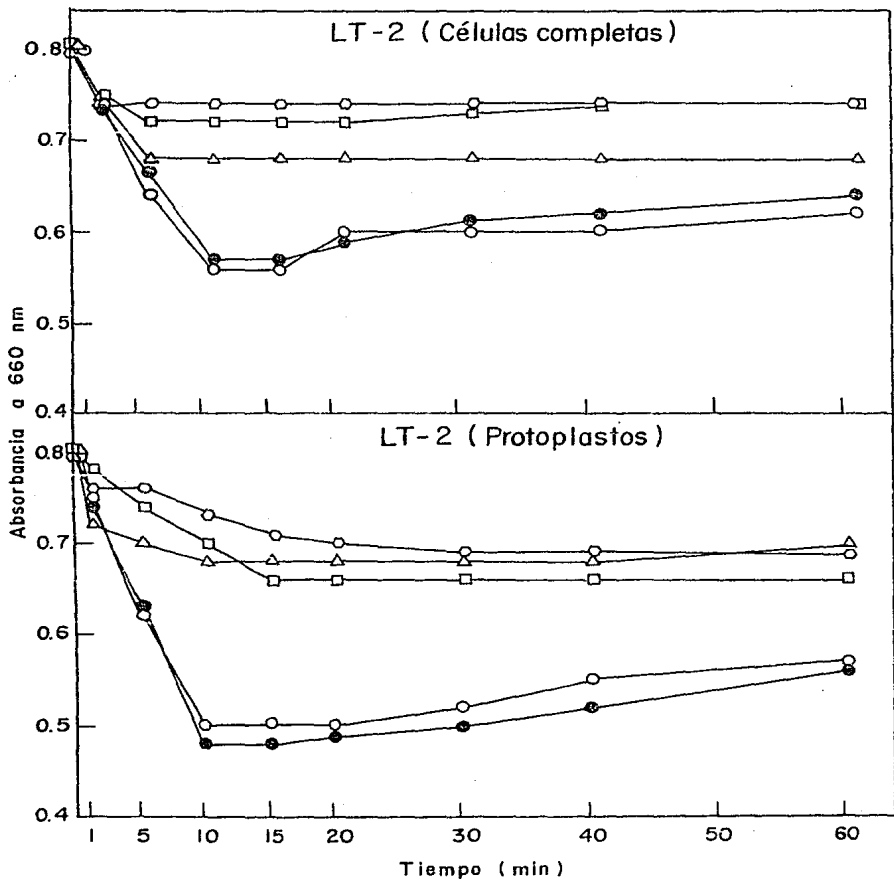


Fig. 4. Hinchamiento celular en *S. typhimurium*  
LT-2 y SM-13 en alta y baja concentra-  
ción de potasio.

- Control con glucosa 0.02M ( sin sacarosa )
- △ Control con sacarosa 0.4M ( sin glucosa )
- Tris Na ( 20 uM de  $K^+$  + glucosa 0.02M + sa-  
carosa 0.4 M ).
- Tris Na ( 2 000 uM de  $K^+$  + glucosa 0.02M  
+ sacarosa 0.4 M ).

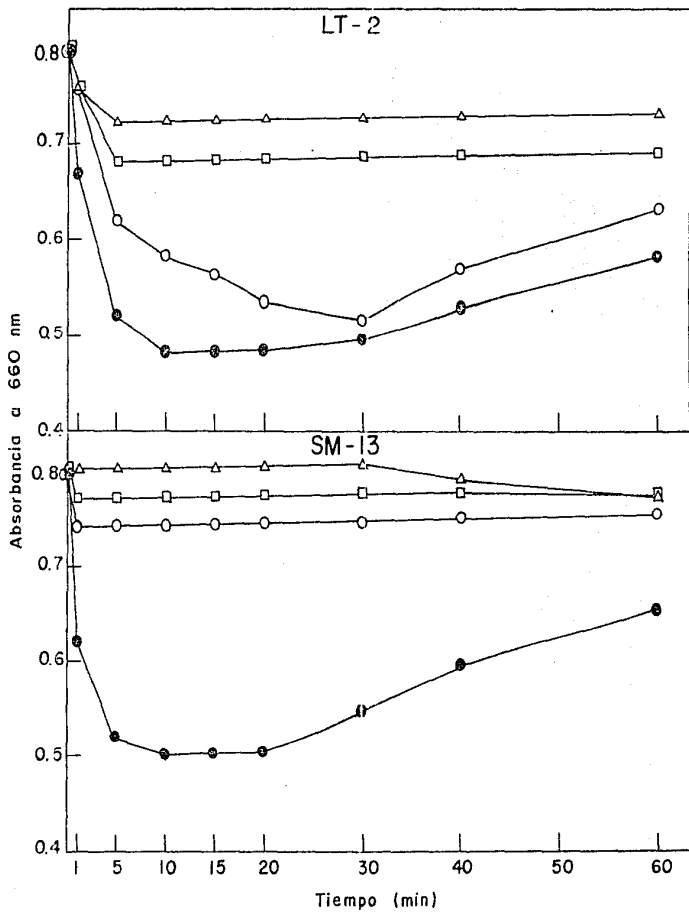


Fig. 5. Hinchamiento celular en S. typhimurium  
 LT-2 y SM-13 en diferentes concentraciones de potasio.

- Control con glucosa ( sin sacarosa )
- △ Control con sacarosa ( sin glucosa )
- Regulador de fosfatos ( 2 000 uM de K<sup>+</sup> )
- Tris Na ( 5 uM de K<sup>+</sup> + glucosa 0.02M + sac. 0.4M)
- ◊ Tris Na (20uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)
- ◐ Tris Na (100uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)
- ▲ Tris Na (250 uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)
- Tris Na (500 uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)
- ▼ Tris Na (1000 uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)
- ▽ Davis N ( 23 000 uM de K<sup>+</sup> + " 0.02M + " 0.4M)



Fig. 6. Hinchamiento celular en S. typhimurium

LT-2 y SM-13 con metoxiglucosa.

- Control con glucosa 0.02 M ( sin sacarosa )
- Metoxiglucosa 0.02 M, sacarosa 0.4 M y  $K^+$  2 000uM
- Glucosa 0.02 M , sacárosa 0.4 M y  $K^+$  2 000 uM



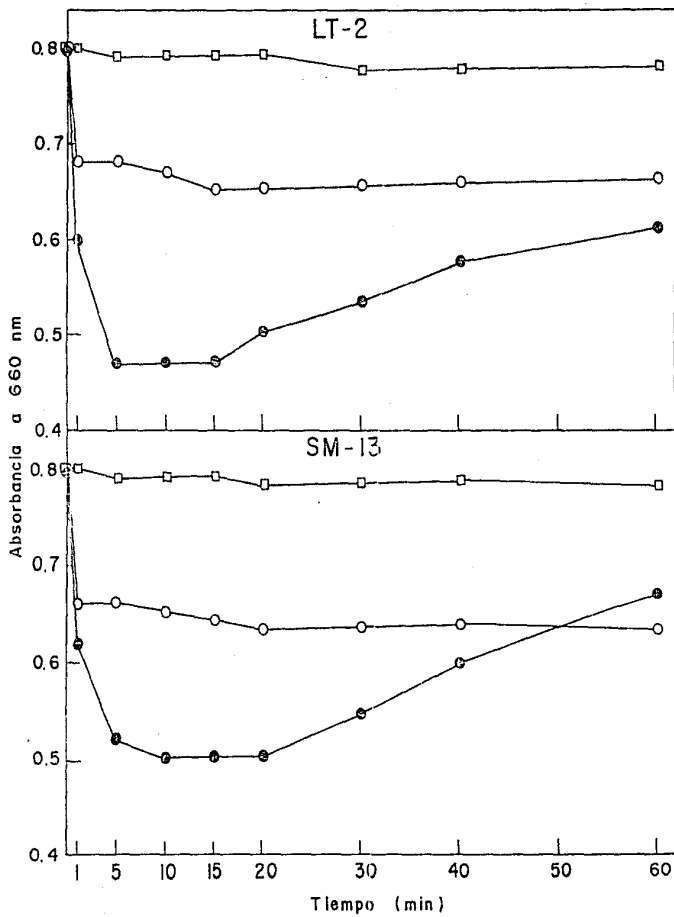


Fig. 7. Hinchamiento celular en S. typhimurium LT-2 y SM-13 en diferentes fuentes de carbono.

- △ Control con sacarosa 0.4M ( sin glucosa )
- Citrato 0.02 M, sacarosa 0.4M y 2 000uM de K<sup>+</sup>
- Acetato 0.02 M, sacarosa 0.4M y 2 000uM de K<sup>+</sup>
- ▲ Glicerol 0.02M , sacarosa 0.4M y 2 000uM deK<sup>+</sup>
- Fructosa 0.02M , sacarosa 0.4M y 2 000uM de K<sup>+</sup>
- Glucosa 0.02 M , sacarosa 0.4 M y 2 000uM de K<sup>+</sup>

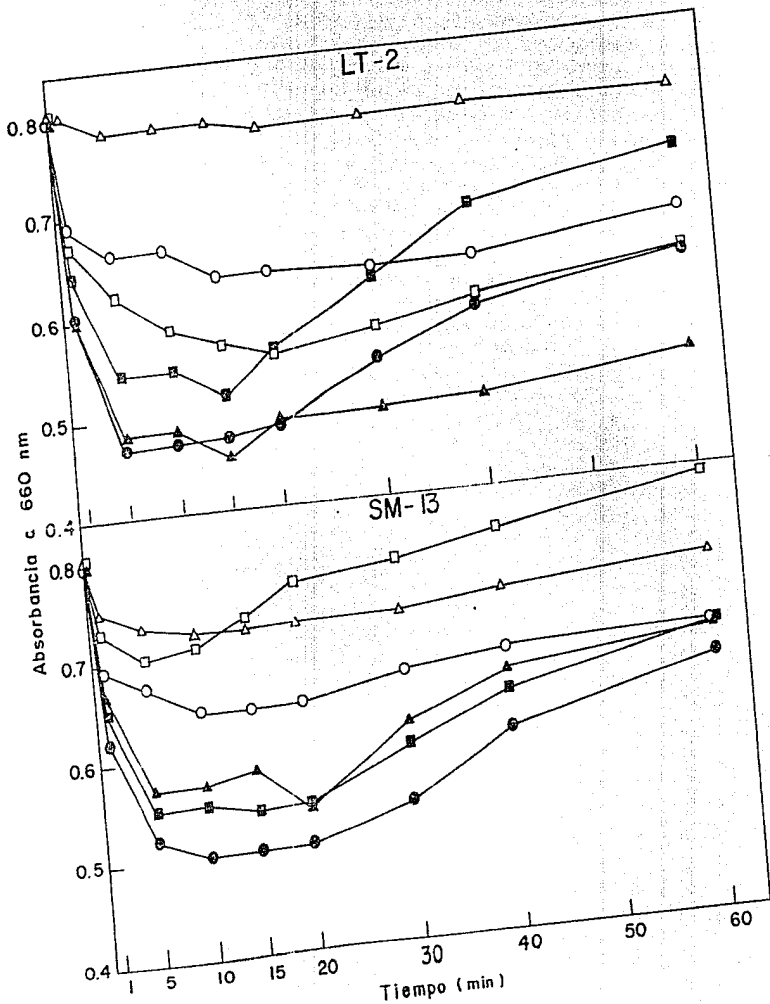
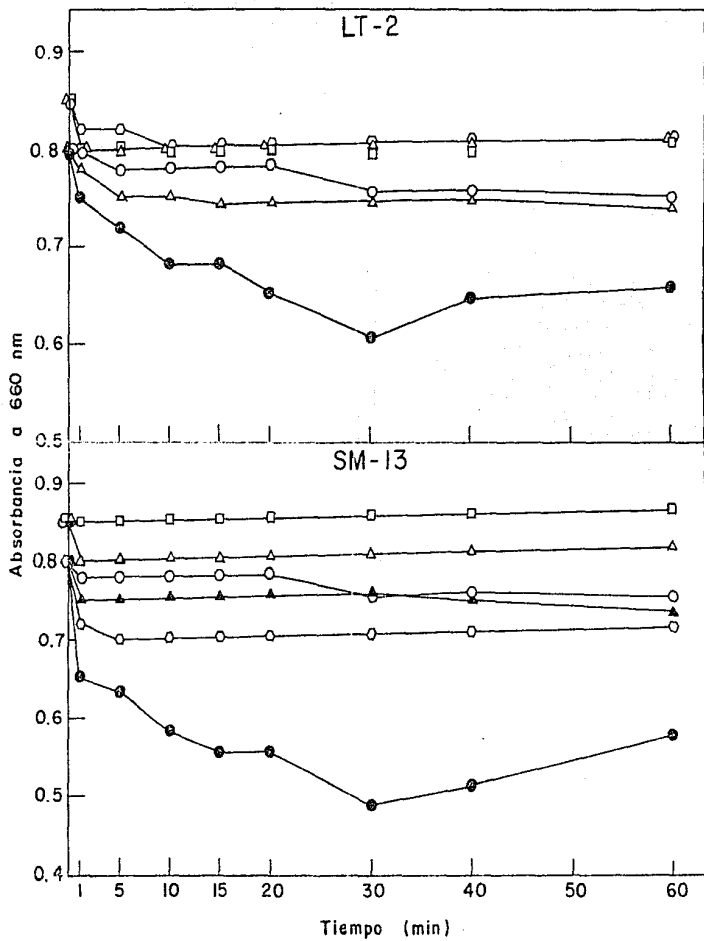


Fig. 8. Hinchamiento celular en *S. typhimurium* LT-2 y SM-13 a bajas concentraciones de potasio utilizando 2,4 dinitrofenol (10 mM).

- Regulador de fosfatos 2 000 uM de  $K^+$
- △ Control sin glucosa, con sacarosa 0.4M
- Control sin sacarosa, con glucosa 0.02M
- Tris Na ( 5 uM de  $K^+$  + sac. 0.4M + glu. 0.02M)
- ◇ Tris Na ( 10uM de  $K^+$  + " 0.4M + " 0.02M)
- ▲ Tris Na ( 20uM de  $K^+$  + " 0.4M + " 0.02M)



## V.- DISCUSION.

En el presente trabajo se trataron de dilucidar dos aspectos principales: la existencia del hinchamiento celular en Salmonella typhimurium LT-2 y la relación de este evento con la concentración del ión potasio.

Para tal efecto se planteó el aislamiento de mutantes de -- transporte de potasio, las cuales fueron obtenidas mediante tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina.

Nuestras mutantes se obtuvieron a partir de la cepa silvestre ( LT-2) en un medio líquido efectuándose un solo tratamiento mutagénico del cual obtuvimos alrededor de 7 cepas que presentaban la característica de no crecer en una baja concentración de -- potasio; sin embargo por medio de cinéticas de crecimiento en -- diferentes concentraciones del ión seleccionamos una sola cepa a la cual se le ha denominado SM-13 la que presentó una mayor estabilidad en cuanto a su incapacidad de crecer en una baja concentración de potasio. Estos resultados son similares a los obtenidos por Lubin y Kessel ( 1960) al aislar mutantes de transporte de potasio en E. coli B incapaces de crecer en una concentración por abajo de 40  $\mu\text{M}$ , y a los de Damadian y Solomons (1964) donde sus cepas obtenidas por mutagénesis con luz UV seleccionadas con penicilina son incapaces del crecer en una concentración de 20  $\mu\text{M}$ .

En nuestro caso la mutante obtenida no creció en medio líquido

do en las primeras siete horas a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , -- sin embargo, después de este tiempo inició un lento crecimiento, esta característica es de considerarse debido a que a su vez se corrieron otros dos matraces de prueba con concentraciones de 10 mM y 23 mM respectivamente y en ambos casos el crecimiento se -- hizo evidente a partir de la tercera hora de incubación; lo mismo ocurrió para nuestra cepa control que fué la cepa silvestre en -- cuyo caso el crecimiento se inició en la tercera hora de incubación pero en este caso para las tres concentraciones, cabe mencionar que en este caso el crecimiento obtenido no es de colonias -- revertantes.

El comportamiento de esta mutante nos hizo suponer que su -- crecimiento era dependiente de la concentración de potasio en el medio y para ello en un posterior experimento se probó adicionar potasio en forma de KCl al matraz de baja concentración del ión ( 20  $\mu\text{M}$  ) para ello el contenido de este se dividió en la tercera hora de incubación en la cual no había indicios de crecimiento; a un matraz " A " se le adicionó el KCl mientras el otro " B " se -- dejó intacto. Pudimos observar que a la cuarta hora de lectura -- mientras que las células de " B " seguían sin crecer, las del --- matraz " A " comenzaron a presentar crecimiento el cual se fué -- incrementando conforme transcurrió el tiempo.

Esto nos sugiere que probablemente nuestra cepa mutante es-

té presentando alteraciones a nivel de transporte del ión , por lo que en baja concentración no se acumula suficiente y ello -- quizá resulte en su bajo crecimiento. Si bien hemos hablado del aislamiento de mutantes de transporte debemos mencionar que el objetivo primordial de este trabajo fué el análisis de un posible efecto de hinchamiento celular en nuestro modelo bacteriano del cual no se tiene hasta la fecha ningún reporte como los ya existentes de Abrams ( 1959 ) en protoplastos y células completas de Streptococcus faecalis y por Minkoff y Damadian ( 1976 ) en células completas de E.coli .

En este trabajo planteamos probar la existencia de dicho -- evento para lo cual probamos reproducirlo como se ha reportado, esto fué tanto en células completas como en protoplastos de --- S.typhimurium LT-2.

Nosotros encontramos que en células completas el hinchamiento ocurrió como una caída brusca en la turbidez del cultivo en los primeros 10 minutos de incubación ; la lectura más baja a la que se llegó se mantuvo por lo general entre 5 y 8 minutos -- más al cabo de los cuales comenzó a subir nuevamente aunque en ninguno de los casos logró alcanzar su valor inicial. En cuanto al ensayo en protoplastos el efecto sucedió igualmente en los -- primeros 10 minutos de incubación , se mantuvo de 5 a 8 minutos, sin embargo en este caso la recuperación no fué muy buena, esto nos sugiere que probablemente debido a la fragilidad de la mem--



brana de estas células haya ocurrido su lisis.

De estos resultados pudimos comprobar que en Salmonella typhi mutum LT-2 el hinchamiento celular sí ocurre, esto en condiciones experimentales que involucran la presencia de una fuente de carbono y energía como es glucosa, de un azúcar impermeable y que a su vez actúa como estabilizador osmótico que es sacarosa y de un adecuado suplemento de potasio.

Si bien la ocurrencia del evento no es exactamente igual en protoplastos y en células completas sin embargo podemos ver que la aparición del fenómeno sucede en condiciones similares a las reportadas por Abrams (1959) y por Minkoff y Damadian (1976) -- donde lo definen como un ciclo de hinchamiento y contracción detectado por la caída brusca en la D.C. del cultivo en un período de 30 a 40 minutos.

Una vez que obtuvimos nuestra mutante de transporte probamos su capacidad de crecimiento en diferentes concentraciones de potasio y encontramos que ésta es capaz de hacerlo solo en concentraciones por arriba de 100  $\mu$ M .

En la figura 4 se presenta la medición del hinchamiento tanto para la cepa silvestre como para la mutante en altas y bajas concentraciones de potasio; nótese que la cepa silvestre presenta hinchamiento en ambos casos en tanto que la mutante lo hace a 2mM -- pero no así en 0,020 mM .

Esto nos permite visualizar que su incapacidad de crecer en baja concentración de potasio y por lo tanto de acumularlo está afectando a su vez su capacidad de presentar hinchamiento celular, para ello probamos ensayar éste para ambas cepas trabajando con un rango de concentraciones que van desde 20  $\mu\text{M}$  hasta 23 000  $\mu\text{M}$  y en la figura 5 puede verse que la cepa silvestre presenta hinchamiento en cualquier concentración del ión, pero en la mutante SM-13 el efecto no ocurre por abajo de 100  $\mu\text{M}$ .

De esto podemos suponer que en nuestra mutante el hinchamiento es un evento que depende de la concentración de potasio presente en el medio de cultivo.

Por otra parte se ha postulado que el hinchamiento es un evento dependiente de glicólisis (esto en *E. coli*) Abrams 1959) y por tal motivo estudiamos esta dependencia en *S. typhimurium*, para ello se planteó utilizar un compuesto similar estructuralmente a glucosa que no fuera utilizado por esta bacteria; encontramos que tanto en la cepa silvestre como en la mutante de transporte de potasio el hinchamiento no ocurrió, mientras que en el control positivo que contenía glucosa se observó la caída de la D.O. de inmediato.

Se sabe que la célula es capaz de introducir este compuesto a su interior pero no es utilizado por ella como sustrato metabólico, por lo que para que el hinchamiento se lleve a cabo se --

requieren no solo de la entrada de glucosa a la célula sino también de su degradación.

Nos propusimos tratar de analizar si otros compuestos tenían el mismo efecto celular, para ello probamos varias fuentes de -- carbono algunas que se degradan por la vía glicolítica como son fructosa y glicerol y otras del ciclo de Krebs que fueron citrato y acetato; encontramos que en ambas cepas cuando se utilizan los sustratos del ciclo de Krebs el fenómeno ocurrió en menor grado que en presencia de fructosa, glicerol y la misma glucosa.

Esto nos comprueba que para ser inducido el hinchamiento se requiere el aporte energético de los compuestos metabólicos de la vía glicolítica así como de un adecuado suplemento de potasio y de sacarosa.

Debemos mencionar que en nuestro trabajo se empleó en forma especial el método de selección con penicilina debido a que por medio de este podemos obtener poblaciones muy selectivas en las cuales hemos eliminado completamente a las bacterias protótrofas permitiéndonos de esta manera que las células auxótrofas sobreviven no se reproduzcan por faltarles el requerimiento.

La modificación hecha por nosotros al método consistió en -- incubar las bacterias resultantes de la mutagénesis en presencia de bajas concentraciones de aminoácidos ( para eliminar auxótrofas ) en un medio con baja concentración de potasio de manera que

## VI.- CONCLUSIONES.

- 1.- La cepa silvestre Salmonella typhimurium LT-2 es capaz de presentar el hinchamiento tanto en células completas como en protoplastos.
- 2.- En la cepa silvestre el hinchamiento puede ocurrir en cualquier concentración de potasio, debido a que no presenta ninguna alteración a nivel de transporte de este ión.
- 3.- La cepa mutante es incapaz de crecer en concentraciones de potasio por abajo de 100  $\mu\text{M}$  .
- 4.- Se requiere un solo tratamiento mutagénico para aislar este tipo de mutantes, siendo además muy importante para ello utilizar el método de selección con penicilina, con el cual se obtienen poblaciones muy selectivas.
- 5.- El hinchamiento celular es un evento que requiere del aporte energético de cualquier intermediario de glicólisis.
- 6.- Consideramos que la cepa mutante SM-13 , por su comportamiento sufrió una mutación en el transporte de potasio o es dependiente del ión.

las mutantes defectuosas en el transporte de este ión ( que no --  
crecen a bajas concentraciones del mismo ) permanecen sin repro-  
ducirse y por tanto, no les afecta la penicilina. Con esta modifi-  
cación solo aquellas células protótrofas incapaces de acumular po-  
tasio pueden permanecer viables y ser posteriormente recuperadas.

## VII.- BIBLIOGRAFIA.

- Abrams A. ( 1958) O-Acetyl groups in the cell wall of Streptococcus faecalis . J. Biol. Chem. 230: 949-959.
- Abrams A. ( 1959). Reversible metabolic swelling of bacterial protoplasts. J. Biol. Chem. 234: 383-388.
- Adelberg E. A. M. Morton and G. Chein Ching Chen.( 1965) -- Optimal conditions for mutagenesis by N-metil N' nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli K-12. Biochem. Biophys.Res. -- Commun. 18: 788-795.
- Bachman R.J. ( 1983). Linkage map of E.coli. Edition 7. Microbiological Reviews. 47: (2): 180-230.
- Bolstein D. and E.W. Jones ( 1969). Nonrandom mutagenesis of E.coli genome by nitrosoguanidine. J. Bacteriol. 98:847-848.
- Cerdá-Olmedo E, P.C. Hanawalt and N. Guerola( 1968) . Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine : map and pattern of replication of the E.coli chromosome. J.Mol. Biol. 33: 705-719.
- Damadian R. and Solomons A.K. ( 1964). Bacterial mutant with -- impaired potassium transport and methionine biosynthesis. -- Science 145: 1327 - 1328.
- Damadian R. (1968 ) . Ion metabolism in a potassium aculation mutant of E.coli. J. Bacteriol. 95:(1): 113-122.
- Davis B.D. and E.S. Mingioli ( 1950). Mutants of E.coli requere--

- ring methionine or vitamine B<sub>12</sub> . J.Bacteriol. 60: 17-28.
- Davis B. Rhoads, Fred B. Waters, and W.Epstein ( 1976) Cation transport in E.coli. VIII. Potassium transport mutants. --- J Gen. Phisiol. 67: 325- 341.
  - Epstein W. and Schults S.G. ( 1965) . Cation transport in -- E.coli . B. Regulation of cation content. J. Gen Phisiol. 49: 221 - 234.
  - Epstein W; and Davis M. ( 1970) Potassium dependant mutants of E.coli K-12 J.Bacteriol. 108: 836-843.
  - Epstein W and Laimins L. ( 1980 ) Potassium transport in -- E.coli diverse systems with common control by osmotic forces. TIBS. Jan. 21-23.
  - Epstein W, Laimins L, and Rhoads D, ( 1981) Osmotic control -- of the kdp operon in E.coli . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 464-468.
  - Epstein W. Whitelaw V, Hesse J. ( 1978 ) A K<sup>+</sup> transport ATPase in E.coli J. Biol. Ghem. 253: (19): 6666 - 6668.
  - Huxley ( 1969 ) The mechanism of muscular contraction , Science 164: 1356- 1366.
  - Kaufman H. and Gorini L. ( 1960 ) Selecting bacterial mutants by the penicillin method. Science 131: 604-605.
  - Korn , E.D. ( 1978 ) Biochemistry of actin and myosin dependent cell motility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 588-599.

- Laimins L. Rhoads D, Altendork K and Epstein W. ( 1978 ) Identification of the structural protein of a ATP driven potassium transport system in E.coli . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: - 3216 - 3219.
- Lederberg J. and Lederberg. ( 1952 ) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63: 399-406.
- Lee , Gold and Mirvish ( 1977) Mutagenicity of 22 nitrosamides and related compounds for Salmonella typhimurium TA 1535. Mutations Res. 48: 131- 138.
- Lubin M and Kessel D ( 1960 ) Preliminary mapping of the genetic locus for potassium transport in E.coli . B.B.R.C. 2:249-255
- Lubin M. (1962) . Enrichment of auxotrophic mutants population by recycling . J. Bacteriol. 83: 696-697.
- Minkoff L. and Damadian R ;( 1976 ) Actin -like protein from E.coli . Concept of cytotonus as the missing link between cell metabolism and biological ion exchange resins. J.Bacteriol . -- 125: 353- 365.
- Mitchel E.:( 1961 ) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism . Nature ( Lond ) 191: 144- 148.
- Parada J.L. y Ortega M.V. ( 1967 ) Growth inhibition by hexoses of a temperature sensitive thiazoleless mutant of Salmonella --



typhimurium . J. Bacteriol. 94: 707-711.

- Rhoads D. and Epstein W. ( 1977 ) Energy coupling to net  $K^+$  transport in E.coli K-12 . J. Biol. Chem. 252: 1394-1401.
- Rhoads D. Laimins B and Epstein W ( 1978 ) Functional organization of the kdp genes of E.coli K-12 . J. Bacteriol. 135: 445- 452.
- Rosen P. Barry. Bacterial transport, Vol. 4. Cap. 6. by Silver Simon.. " Transport of cations and anions " 222-234 Marcel Dekker Inc. ( 1978 ) New York U.S.A.