

74

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

METABOLISMO DE SALMONELLA TYPHI

I.—CICLO DE KREBS

MARIA ANTONIETA FLORES BUSTAMANTE



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.

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

METABOLISMO DE SALMONELLA TYPHI
I.—CICLO DE KREBS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

MARIA ANTONIETA FLORES BUSTAMANTE

1957

A mis Padres:

Don José Antonio Flores Fagoaga

y

Dña. Rosa María Bustamante de Flores Fagoaga

*con todo cariño y como
un pequeño tributo a
sus esfuerzos.*

A mis Tíos y a mis Padrinos,

por su valioso estímulo.

*Con especial reconocimiento y gratitud
al Director de la Facultad de Química "Berzelius",*

Dn. Luis M. Vereca.

Al Sr. Dr. Jesús Kumate,

*con agradecimiento por su
valiosa dirección.*

A mis Hermanos:

Oscar Ignacio.

Héctor Ignacio.

José Humberto.

María Cristina,

con el cariño de siempre.

A la memoria de mis abuelitas:

Dña. Luz Vasconcelos Vda. de Bustamante.

Dña. Ignacia Rueda Vda. de Fagoaga.

A la H. Institución del "Hospital Infantil".

Al Sr. Dr. Fernando Espinosa O.

Al Sr. Dr. Lázaro Benavides.

*A mis Profesores de la Facultad de
Química "Berzelius",*

con respeto y gratitud.

*A las Directoras y mis Profesores
del Colegio "La Florida",*

con respeto y gratitud.

A la Srita. Q.D.B.

Virginia Vázquez,

por su eficaz ayuda.

A mis Compañeros,

con estimación

A mis Primos,

carísimamente.

CAPITULOS

- I.—INTRODUCCION.
- II.—MATERIAL Y METODOS.
- III.—RESULTADOS.
- IV.—DISCUSION.
- V.—RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- VI.—BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

El conocimiento de los ciclos metabólicos de las bacterias ofrece al bioquímico un problema interesante: en efecto, la exploración de los ciclos metabólicos convencionales en vegetales y animales ha revelado que la inmensa mayoría los utiliza comúnmente como medios muy importantes para su aprovechamiento energético; sin embargo, las desviaciones colaterales a los esquemas universales o la inclusión de nuevos metabolitos son muy numerosos y ésta variación tiene tendencia a una mayor incidencia en el campo microbiológico donde las posibles variaciones alcanzan un número muy elevado. En algunos casos, se han planteado nuevos ciclos como el dicarboxílico de Wood y Werkmann o el correspondiente al acetilmetilcarbinol.

La presencia de enzimas de adaptación o la posibilidad de inducción enzimática hacen que un metabolito extraño en los caminos clásicos, tenga grandes posibilidades de ser utilizado: cosa que podría antojarse imposible en un vertebrado superior, por tanto, la ausencia de individuación observada en prácticamente todas las células de los tejidos de vertebrados y de muchos invertebrados, sufre un cambio brusco en el terreno microbiológico: en éstos microorganismos si bien es conservado el patrón metabólico general se realizan una serie de reacciones en base a metabolitos naturales de los ciclos convencionales que en ocasiones desvían los productos a compuestos muy diferentes a los esperados.

En el caso de *Salmonella Typhi*, los estudios enzimáticos no son tan amplios como en otras enterobacteriáceas que han sido exploradas in extenso, vgr. *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras: en el caso del bacilo tífico, la información asequible a nuestra revisión bibliográfica previa se reduce a:

- 1.— Q_{O_2} de 95 (expresado como mg. de peso seco bacteriano) en medios con glucosa (110 μ M) (1).
- 2.—Actividad deshidrogenante hacia la mayoría de los colorantes de oxidoreducción (2) en cultivos de caldo simple y en medios con glucosa cuando se mide su capacidad deshidrogenásica con indicadores de tetrazolio (3).

- 3.—Utilización aerobia del ácido l-glutámico y l-tirosina, cuya magnitud es función del contenido en antígeno Vi (4).
- 4.—Actividad arilsulfatásica hacia el 2-hidroxi, 5-nitrofenil sulfato (5), con mayor intensidad en las cepas con más antígeno Vi y
- 5.—Presencia de fosfatasas (6).

Con estas bases es fácil ver que no es posible incluir a *S. typhi*, como participante de cualquier esquema degradativo en carbohidratos o proteínas.

Por otra parte la acción de los antibióticos y la de la cloromicetina en particular, sobre *S. typhi*, se antoja confusa cuando se intenta proponer un mecanismo de acción racional ya que las interferencias señaladas (utilización de aminoácidos, grasas y ésteres, así como modificaciones en el patrón enzimático de adaptación y utilización energética (7-9), no tienen un estudio metabólico correspondiente en *Salmonelas* por lo que nos encontramos ante la situación paradójica de que en el caso del germen en donde es más útil dicho antibiótico, no se han hecho estudios tendientes a relacionar metabolismo y bloqueos enzimáticos de origen quimioterápico.

Con estos antecedentes nos pareció interesante el estudio de los ciclos metabólicos fundamentales de *Salmonella typhi*, así como la acción de la cloromicetina en las fases más representativas de la región a explorar; por la facilidad de manejo y como revisión preliminar, escogimos algunos metabolitos básicos del ciclo de Krebs para estudiar su Q_{02} .

Piruvato, citrato, alfa-cetoglutarato y succinato; son 4 ácidos participantes en el ciclo del ácido tri-carboxílico; el piruvato ingresa previa descarboxilación oxidativa a acetilcoenzima A y transaminar con alamina en el sistema glutámico-pirúvico o hidroxipirúvico (a serina); entronca con el metabolismo de grasas en el fragmento de 2 carbonos; el citrato resulta de la acción de la enzima condensante y es el 1er. ácidotricarboxílico; el alfa-cetoglutarato es el producto de una descarboxilación simple del oxaluccinato y puede transaminar a glutámico con prácticamente todos los aminoácidos conocidos, el succinato es el primer ácido dicarboxílico, y la fenilalanina puede relacionarse con el ciclo vía fumarato después de la ruptura de su anillo bencénico y transformación previa al acetoacetato.

MATERIAL Y METODOS

Los Q₁ se estudiaron en 11 cepas aisladas de niños con tifoidea activa: todos poseían antígeno Vi y se encontraron en fase V W; las cepas se mantuvieron en caldo simple (0.3 gs. de extracto de carne "Difco", 1 g. de peptona "Difco", 0.5 gs. de cloruro de sodio y agua destilada (b.p. 100 cc.) ajustado a pH 7.4 con NaOH), por lo menos durante 5 días consecutivos con pase diario; en la última parte se inocularon en cajas Petri con Agar al 2% (2 gs. de agar-agar en 100 cc. de Caldo simple) y se incubaron 20 horas a 37°C. La cosecha se hizo por raspado y suspensión en amortiguador Sørensen M 15 a pH 7.8. La dilución se hizo de manera que 1.0 ml. de la suspensión final diluida 1:3 con el amortiguador diese una

$$\text{D.O. de 0.5} \frac{(\text{D.O.} \times V_i)}{\text{D.O.}_x} = V_T$$

V-total-V_i = cc. para añadir al volumen inicial.

D.O._i = Volumen inicial.

V_i = Volumen inicial.

D.O._x = Densidad óptica buscada.

V_T = Volumen total.

en celdillas 6-104 de espectrofotómetro Coleman Jr.; dicha D.O. corresponde a un peso seco de 10.1 mg/ml. La determinación se hizo por quintuplicado; en pesafiltros tarados se puso 1.0 ml. de suspensión bacteriana en agua a una D.O. de 0.5; se mantuvieron a 100°C hasta peso constante y por diferencia con los pesos anteriores se obtuvo la cantidad de bacterias secas.

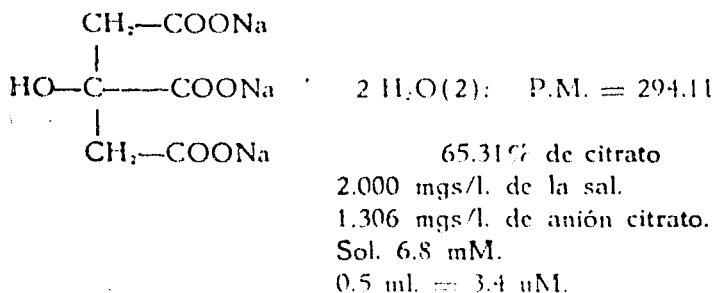
Pesafiltros vacíos	Pesafiltros con bacterias	Diferencia.
16.4655 gs.	16.475 gs.	0.0095 gs.
16.709 gs.	16.7195 gs.	0.0105 gs.
17.8665 gs.	17.8770 gs.	0.0105 gs.
16.115 gs.	16.124 gs.	0.0090 gs.
16.524 gs.	16.525 gs.	0.0110 gs.

Total = 0.0505 gs.

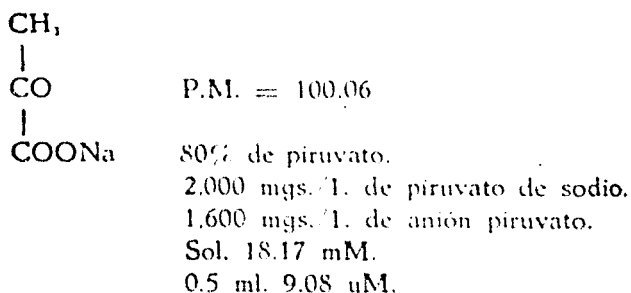
0.0505 gs. / 5 = 0.101 gs. = 10.1 mgs./ml. de bacterias.

Los substratos utilizados fueron ajustados a un pH de 7.8 y las concentraciones utilizadas fueron:

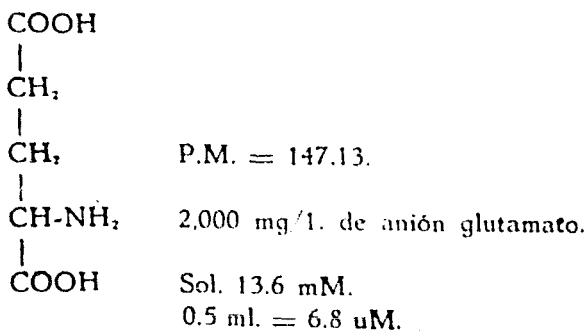
Citrato de sodio "Fisher"



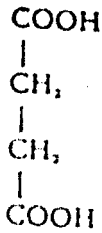
Piruvato de sodio "Merk"



Acido Glutámico "Eastman Kodak" L-(+)



Acido Succinico "Merk"



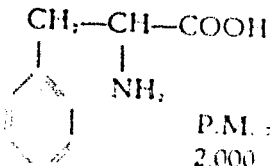
P.M. = 118.08.

2.000 mg/l. de anión succinato.

Sol. 17 mM.

0.5 ml. = 8.5 uM.

Fenilalanina "Pfanzstichl"



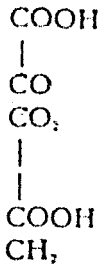
P.M. = 165.19.

2.000 mg l. anión fenilalanina.

Sol. 12.11 mM.

0.5 ml. = 6.05 uM.

-ceto glutarato "Nutritional Biochemicals Corporation"



P.M. = 146.1.

Sol. 13.79 mM.

2.000 mg/l. de anión cetoglutarato.

0.5 ml. = 6.84 uM.

- 6.8 uM para citrato (3.4 uM/frasco).
- 18.17 uM para piruvato (9.08 uM/frasco).
- 13.6 uM para glutamato (6.8 uM/frasco).
- 17.0 uM para succinato (8.5 uM/frasco).
- 12.11 uM para fenilalanina (6.05 uM/frasco).
- y 13.7 uM para alfa-cetoglutarato (6.85 uM/frasco).

La cloromicetina se usó en forma de la sal pura, variedad levó-gira y se manejó a base de una solución en amortiguador Sørensen M/15 a un pH 7.8 que resultó con 1 mg/ml. El antibiótico y las bacterias se incubaron 2 horas a 37°C. antes de iniciar la medición del Q_{O_2} .

La técnica para medir Q_{O_2} fue la descrita en los manuales standard de Bacteriología (10). se empleó un aparato de Warburg circular, Modelo W.-Mohle, con termostato que garantiza variaciones no mayores de 0.01°C. a 38°C y con 120 oscilaciones/minuto de un arco de 68°. El contenido de los frascos fue de 1 ml. de suspensión bacteriana en el frasco general, 0.5 ml. de los substratos en el brazo lateral y 0.17 ml. de NaOH al 20% en la copa central la atmósfera del frasco fue aire. La cloromicetina se agregó en razón de 100 ug./ml. de suspensión y la densidad bacteriana en el sistema control se mantuvo adicionando una cantidad equivalente (en volumen) de amortiguador.

Un frasco con 1 ml. de suspensión bacteriana y 0.5 ml. de amortiguador en el brazo lateral sirvió como control de respiración endógena. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

El tiempo de observación del consumo de oxígeno se prolongó 60 minutos y el periodo de equilibrio térmico de 10 minutos, se siguió de 5 minutos de mezcla a los componentes del sistema con atmósfera libre.

Las constantes de los frascos se determinaron según el monograma de Dixon (11); el líquido empleado fue el de Brodie (23 gs. de NaCl, 5 gs. de Coleato sódico "General Biochemicals Inc." en 500 cc. de agua destilada.

$$\text{Densidad 1.033; } P_0 = 10,000 \frac{590}{760} = 7763 \text{ y Azul de}$$

Evans (200 mg/l.).

La presión atmosférica se midió mediante un barómetro de mercurio que permite interpolaciones de menos de 0.005 cc. de mercurio.

Como termobarómetro se utilizó un frasco con 1.67 ml. de amortiguador Sørensen M/15, a un pH 7.8.

La limpieza del material dada la naturaleza de las bacterias utilizadas se hizo por el método del dicromato ácido; previa esterilización creciente durante lapsos de 1 y 2 horas.

Los cálculos del consumo de O_2 se hicieron sobre la base de 22.4 ul para luM de O_2 y los resultados de Q_{O_2} se expresan como peso seco en mg/ml; la reproducibilidad de este modo de expresión resultó ser 0.31%.

A continuación tenemos un ejemplo representativo de la Determinación de la Constante de un frasco.

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} \times Vf \alpha}{P_o}$$

$$P_o = PA \times \frac{13.6}{1.033}$$

$$K = \frac{V_g \times 273 + Vf \alpha T}{T}$$

$$K = \frac{PA \times \frac{13.6}{1.003}}$$

$$K = \frac{V_g \times 273 + Vf (\alpha) (311) 1.033}{311 \times 13.6 \times 591}$$

V_g = Volumen del frasco hasta la marca.

T = Temperatura absoluta + temperatura a que se hicieron las lecturas $273 + 38 = 311$.

Vf = Volumen del liquido = Volumen de bacterias + volumen de substrato + volumen de la NaOH.

Ejemplo:

$V_g =$ Volumen del frasco + volumen del manómetro + volumen del líquido.

Volumen del frasco = 16.47.

Volumen del manómetro = 0.16.

Volumen del líquido = 1.67.

$V_g = 16.47 + 0.16 + 1.67 = 14.96.$

$V_f = 1.0 \text{ cc.} + 0.5 \text{ cc.} + 0.167 = 1.67 \text{ cc.}$

$\alpha = 0.027.$

PA = 591

$$K = \frac{V_g \times 273 + V_f (\alpha) (311) 1.033}{311 \times 13.6 \times 591}$$

$$\dot{K} = \frac{14.96 \times 273 + 1.67 (0.027) (311) 1.033}{311 \times 13.6 \times 591}$$

$$K = 1.802910$$

Tabla No 1

Ejemplo. Representativo de los protocolos utilizados para el calculo de Q_{O_2}

Respiración Endogena					Bacterias con Cloro y con Substrato					Bacterias sin Cloro y con Substrato											
T	T _b	M	Δ_{10}	Δ_{Tb}	Δ_{-O_2}	$\Sigma -O_2$	T	T _b	M	Δ_{10}	Δ_{Tb}	Δ_{-O_2}	$\Sigma -O_2$	T	T _b	M	Δ_{10}	Δ_{Tb}	Δ_{-O_2}	$\Sigma -O_2$	
0	152	158					0	159	110					0	153	157					
10	159	150	6	-2	417.2	7.2	10	159	112	12	0	11	261	10	159	159	22	0	112	6216	6216
20	159	147	5	0	5	5.4	20	159	121	14	0	14	267	20	159	91	29	0	77	5457	1147
30	150	141	6	0	6	10.8	30	159	110	11	0	11	272	30	159	97	36	0	83	6738	1824
40	150	138	3	0	3	5.4	40	159	108	10	0	10	287	40	159	14	41	0	81	7738	2324
50	150	134	4	0	4	7.2	50	159	96	4	0	4	248	50	159	0	0	0	0	1024	2947
60	150	134	0	0	0	0.0	60	159	92	4	0	4	248	60	159	0	0	0	0	1128	306

T = Minutos a que se hicieron las lecturas.
 T_b = Lecturas obtenidas en el termobarometro.
 M = Lecturas " " " " " manometro.
 Δ_{10} = Diferencia de lecturas en el manometro a los 10 minutos.
 Δ_{Tb} = Diferencia " " " " " termobarometro a los 10 minutos.
 Δ = Diferencia total.
 $-O_2$ = ul de O_2 consumidos.
 $\Sigma -O_2$ = Consumo total de O_2

RESULTADOS

a.—Los resultados obtenidos como el material antes mencionado se presentan en forma de gráficas en las marcadas del I al IX. En las gráficas I-III están representados los consumos de O_2 para piruvato de cepas que respondieron en forma diferente a la acción de la cloromicetina y que aproximadamente mostraron el mismo Q_{O_2} , el promedio del consumo fue de 194 ul hora. \approx 32.5% el que dividido por 22.4 informa que con 8.65 μ M de O_2 se utilizaron en la oxidación de 9.08 μ M de piruvato, la relación de μ M de O_2 μ M de piruvato es de 0.954, si se toma en cuenta la dispersión natural en esta clase de experiencias se puede considerar que 1.0 es la cifra más aproximada.

La cloromicetina a concentraciones de 100 y ml. de suspensión bacteriana produce interferencia en la oxidación de piruvato en proporciones variables pero siempre bien apreciables, el promedio de la interferencia descrita es de 75% y su desviación standard de 23% con un coeficiente de Pearson del 41% por lo que no consideramos representativo dicho valor, sin embargo nos indica que existe una clara acción del antibiótico sobre el metabolismo oxidativo del sustrato estudiado.

b.—*Citrato*: De las 11 cepas estudiadas solamente 4 mostraron utilización de O_2 , el promedio de su consumo de O_2 fué de 37 ul o 1.3 μ M de O_2 que en relación con las 3.4 μ M de sustrato empleados nos dan un valor de 0.485 o sea casi un átomo de oxígeno por mol de citrato, los efectos del antibiótico fueron casi nulos. Gráficas IV y V.

c.—*Alfa-cetoglutarato*: La oxidación de este sustrato se hizo aparentemente en solo 6 cepas y el promedio de los consumos fué de 26.3 ul (1.17 μ M de O_2) y la relación consumo sustrato \approx 0.17. Gráfica VI.

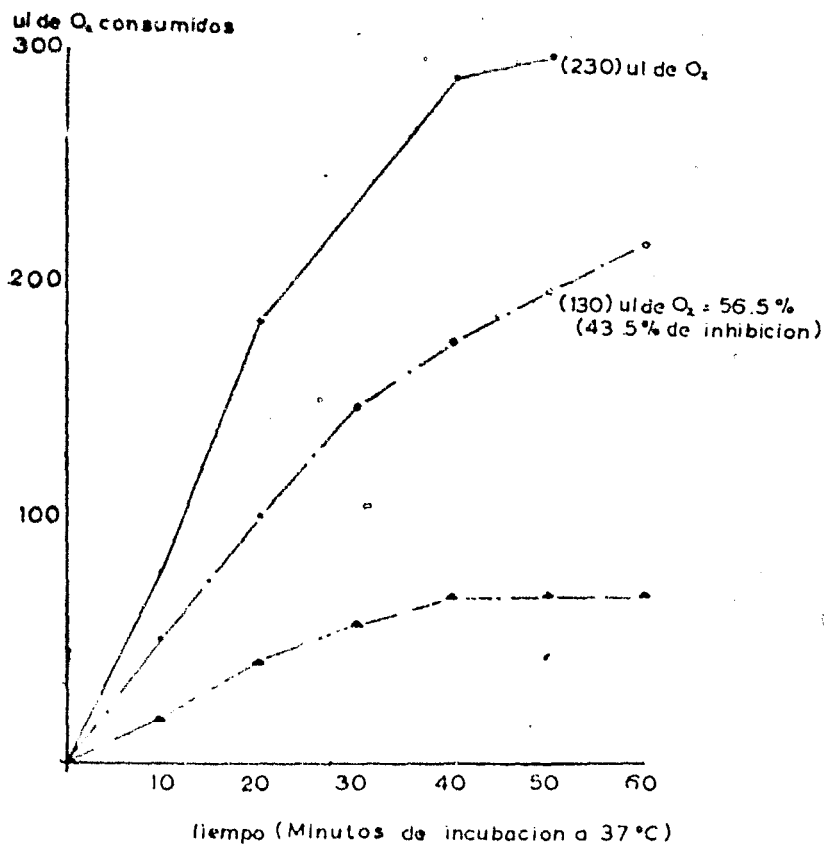
d.—*Succinato*: En 8 cepas se observó utilización y el promedio de su Q_{O_2} fué de 42.5 ul (1.9 μ M de O_2) y la relación consumo/sustrato fue de 0.31, la acción de la cloromicetina fué variable. Gráfica VII.

e.—*Glutamato*: Mostró ser utilizado por 7 cepas con cifras de consumo que dieron un promedio de 46.5 ul o 2.08 μ M de O_2 con relación consumo sustrato \approx 0.305. Gráfica VIII.

f.—*Fenilalanina*: Ninguna de las cepas estudiadas reveló consumos definidos de O_2 . Gráfica IX.

GRAFICA No 1

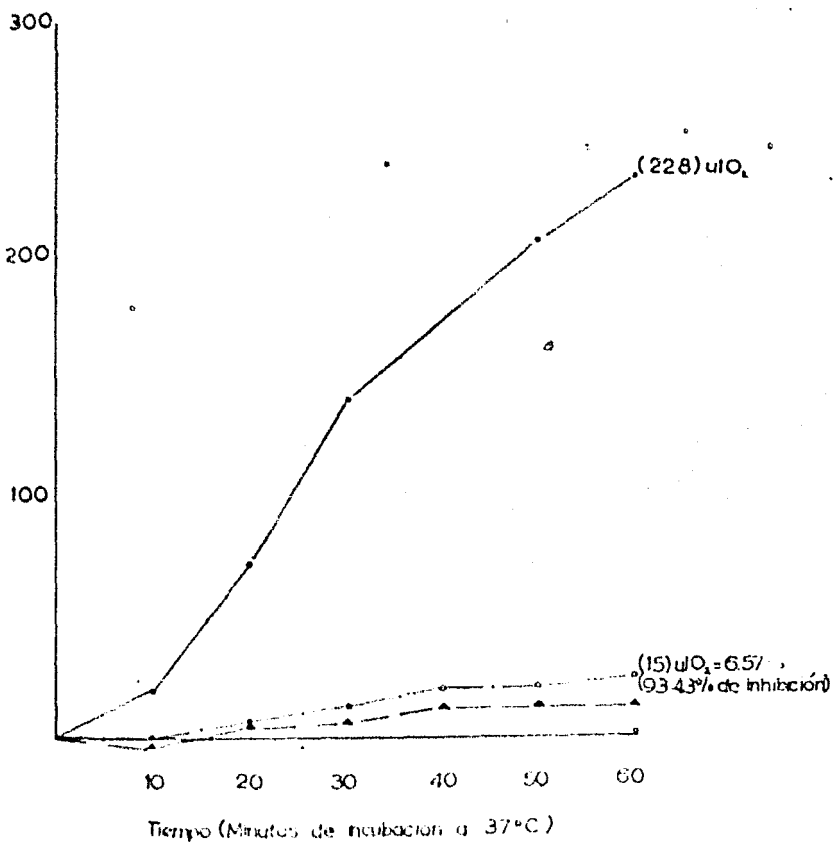
- STyphi (9,1uM de Piruvato)
- STyphi cloromicetina 100 μ /ml de bacterias + 9,1uM de Piruvato
- ▲ STyphi (respiración endogena)



GRAFICA No II

- STyphi + (9.1 μ M de Piruvato)
- STyphi + cloranfenicol 100 μ g/ml de bacterias + 9.1 μ M de Piruvato
- ▲—▲ STyphi (respiración endógena)

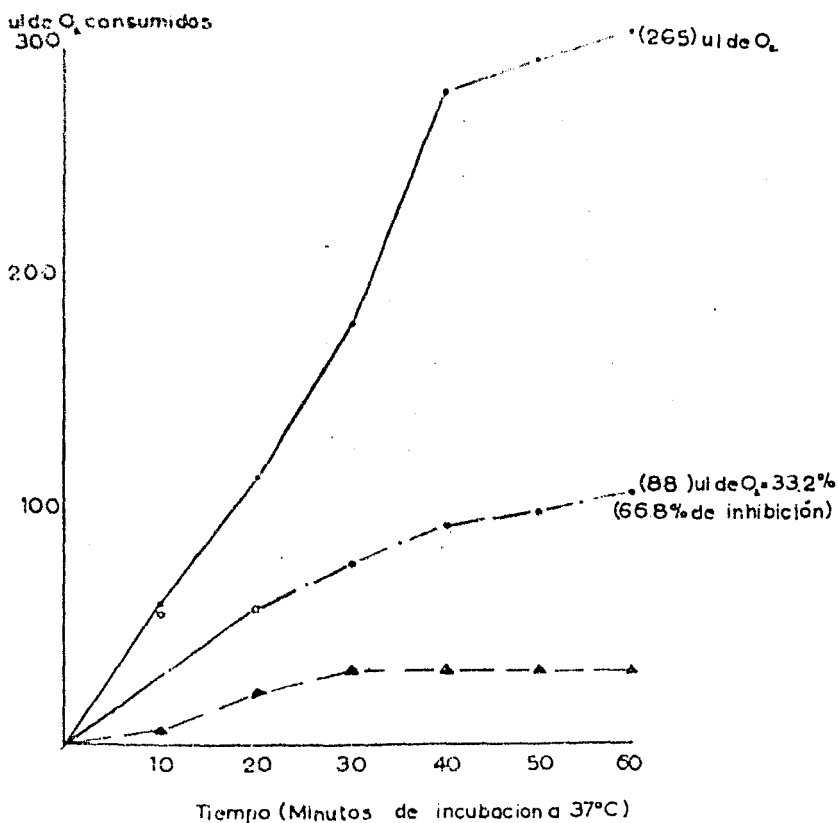
μ l de O_2 consumidos



★ Cepa. de R 206585

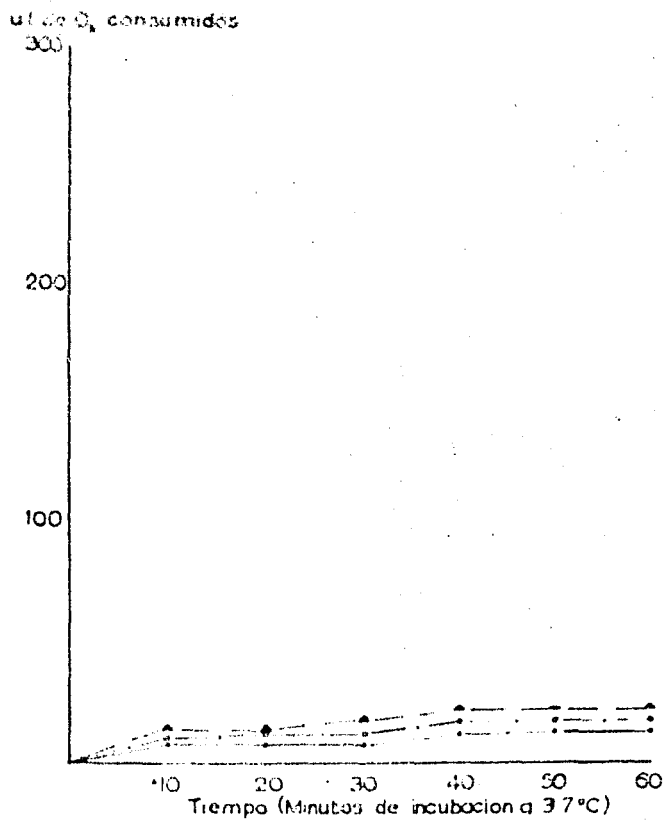
GRAFICA No 111

- STyphi (91 uM de Piruvato)
- STyphi (cloromicetina 100 μ /ml de bacterias + 91 uM de Piruvato)
- ▲—▲ STyphi (respiración endógena)



GRAFICA No. IV

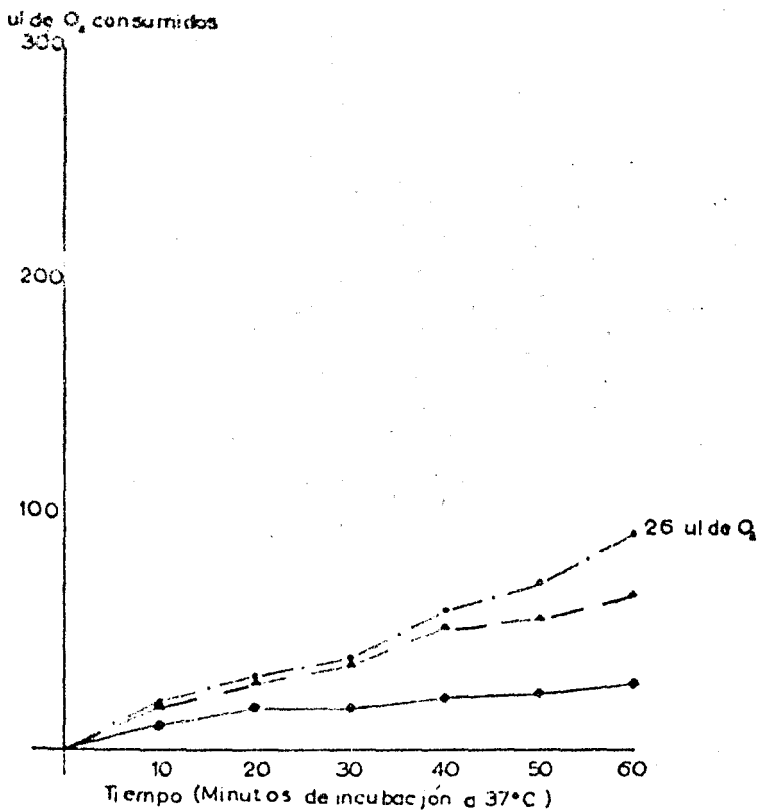
- STyphi (34 μ M de Citrato)
- STyphi (cloromicetina 100 μ g/ml de bacterias + 34 μ M de Citrato)
- STyphi (respiración endógena)



CEPA, I.S. 212497

GRÁFICA No 7

- STyphi (34 uM de Citrato)
- STyphi (cloromicetina 100 μ g/ml bacterias, 34 uM de Citrato)
- ▲— STyphi (respiracion - endogena)



CEPA C 206374

GRAFICA No VI

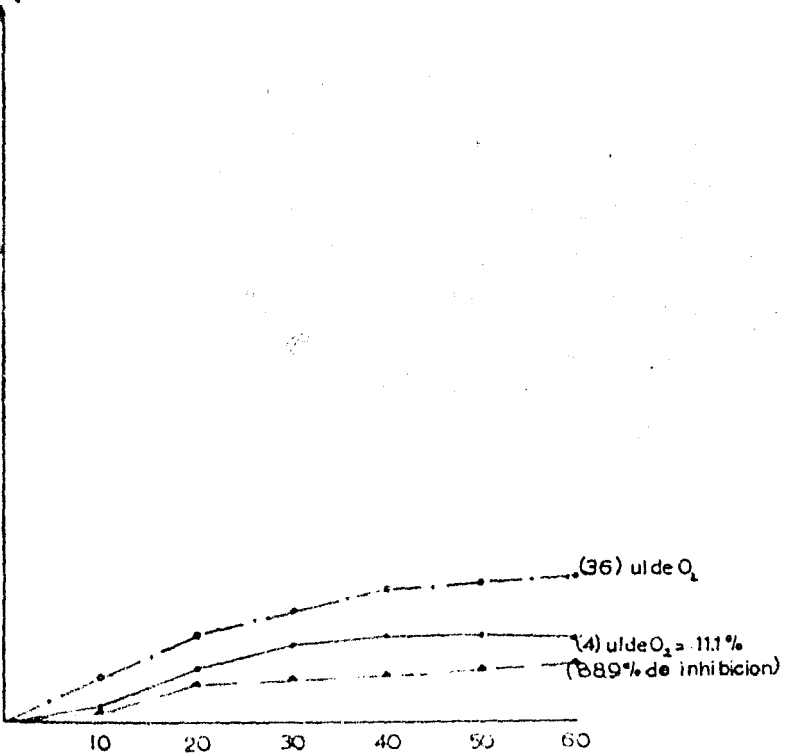
- STyphi + (6.85 μ M de α -cetoglutarico)
- STyphi + clonamicetina 100 μ g/ml
bacterias + 6.85 μ de α -cetoglutarico
- STyphi (respiracion endogena)

μ l de O_2 consumidas

300

200

100

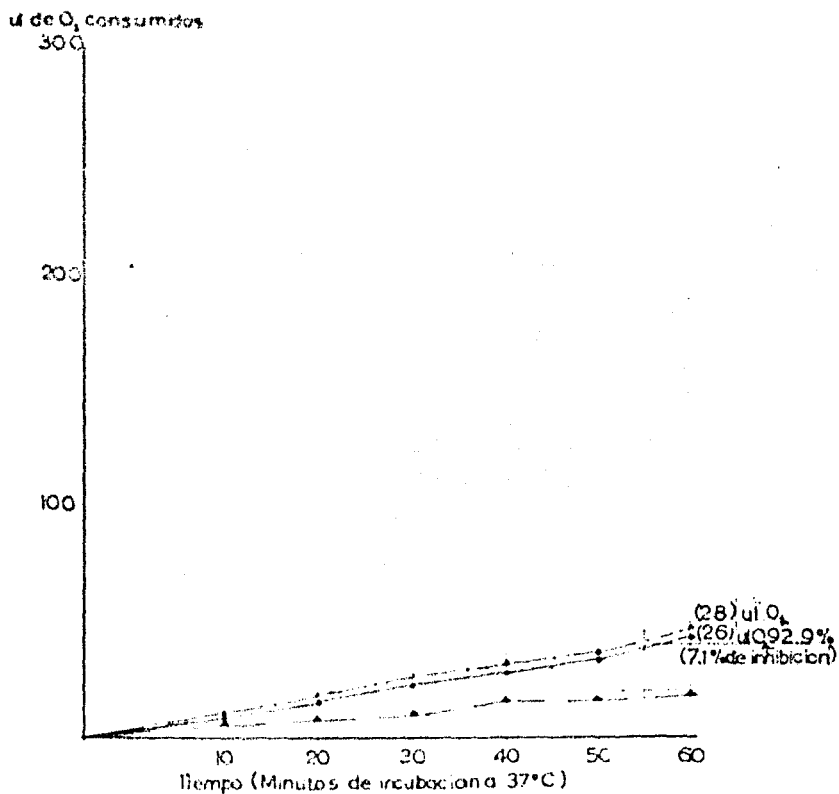


Tiempo (Minutos de incubación a 37°C)

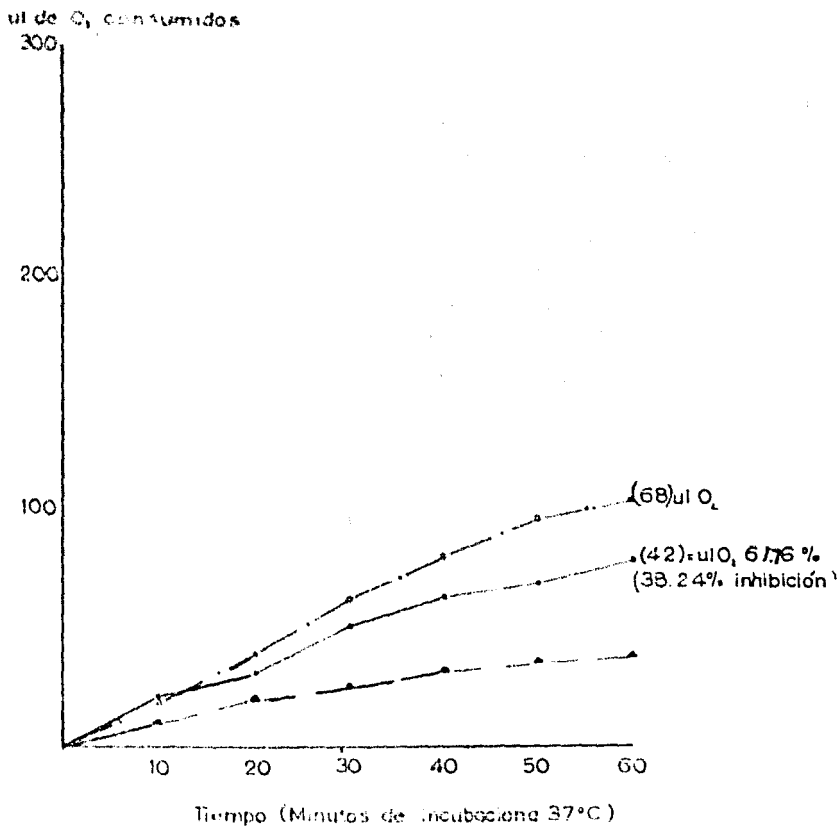
CEPA LIT. 212703

GRAFICA No. VII

- STyphi (8,5 uM de Succinato)
- STyphi (cloramfenicol 100% de bacterias - 8,5 uM de Succinato)
- STyphi (respiración endógena)

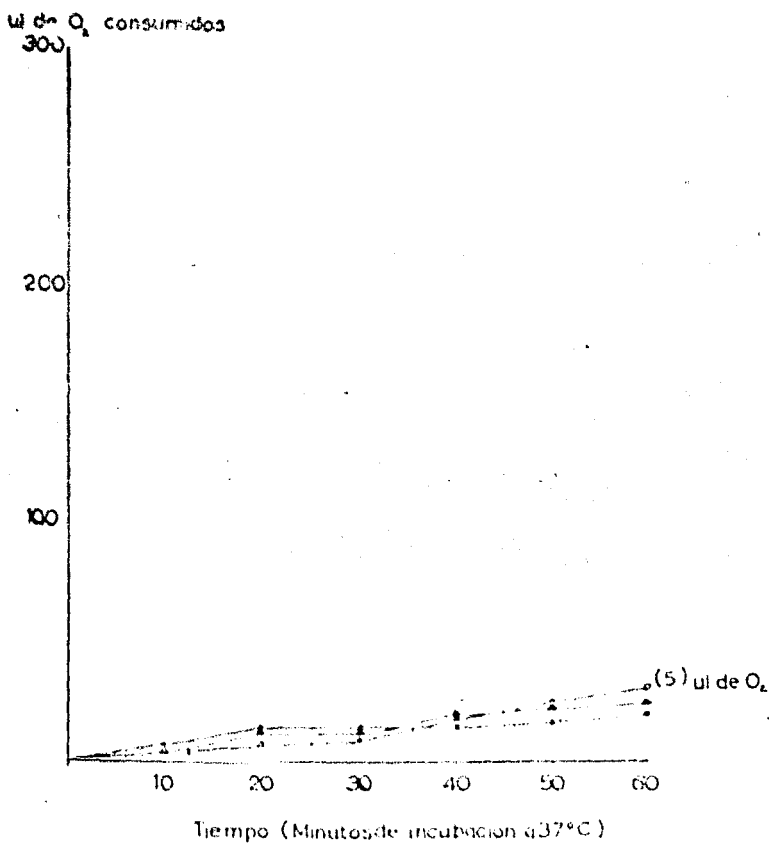


- STyphi (68 uM de Glutamato)
- STyphi (cloramfenicol 100 μ /ml
bacterias + 68 uM de Gluta
mato)
- STyphi (respiracion endogena)



GRAFICA No IX

- STyphi (6.05 μ M de Fenilalanina)
- STyphi (cloramicetina 100 μ /ml de bacterias, 6.05 μ M de Fenilalanina)
- ▲ STyphi (respiracion endogena)



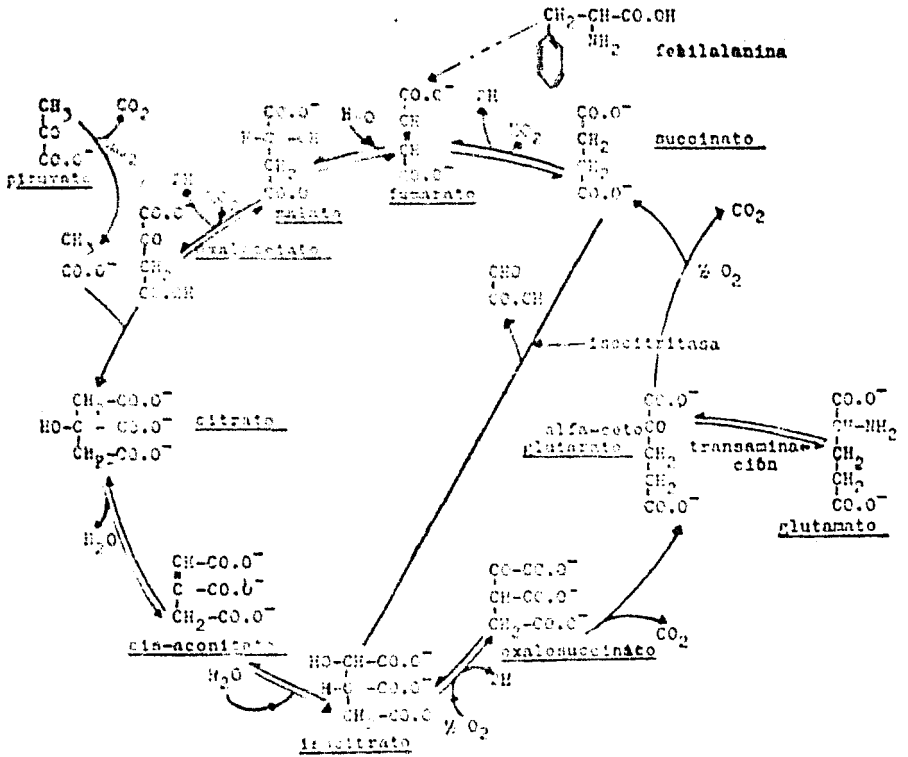
CEPA V. 20 6485

DISCUSION

Los resultados mencionados señalan claramente que existe una diferencia definida entre la utilización del piruvato y las correspondientes a los otros 3 metabolitos del ciclo de Krebs (citrato, alfa-cetoglutarato y succinato) así como los de los 2 aminoácidos utilizados y que por diversos mecanismos entroncan con miembros del mismo ciclo (alfa-cetoglutarato en el caso del ácido glutámico y fumarato en el caso de la fenilalanina).

En el caso del piruvato se tiene una oxidación que utiliza 8.55 μM de O_2 por 9.08 μM de piruvato o sea 1 mol de O_2 /mol de sustrato (sobre la base de que se haya utilizado completamente el piruvato adicionado; presupuesto relativamente aceptable ya que el periodo final de observación muestra tendencia a meseta) en cambio en todos los demás sustratos el máximo de μM de O_2 consumidos llegó apenas a 2.08 en el caso de glutamato o valores menores a 2.0 en todos los demás y en el caso de la fenilalanina ningún consumo.

CICLO DE KREBS



Vistos en conjunto los datos anteriores plantean dudas acerca de la utilización del ciclo de Krebs como ruta metabólica constante en esta clase de salmonela; en efecto, la oxidación del piruvato indica transformación oxidativa que no llega a fragmentos de 1 carbono en su máximo estado de oxidación (formato) y que para un balance sugestivo de ciclo de Krebs requeriría 2.5 como valor de la relación consumo sustrato. El comportamiento de los demás sustratos estudiados aмен de ser ocasional, el menos eventual fué el glutamato (7 cepas de las 11 estudiadas) pero en la mayoría de los casos menos de la mitad de las cepas mostró actividades oxidativas hacia los diversos sustratos que no fueron piruvato y en los casos que mostraron alguna actividad esta fué alrededor de 1 átomo de oxígeno por mol de sustrato o sea el equivalente a una deshidrogenación simple que supondría la oxidación parcial y de ninguna manera su manejo en forma cíclica por las bacterias estudiadas. En el caso del glutamato éste paso sería el correspondiente a la desaminación oxidativa o a la oxidación del alfa ceto-glutarato resultante de una transaminación previa ya que este esteroideo muestra caminos similares a los del glutamato en las mismas condiciones experimentales. El consumo observado en las 4 cepas que utilizaron citrato apenas alcanzaría para una transformación simple se requeriría un consumo extra por la producción del alfa ceto-glutarato. En el caso del succinato se puede sostener solamente su transformación a fumarato. El comportamiento del alfa ceto-glutarato puede explicarse como una transformación a succinato e incapacidad de esa cepa para utilizar succinato, situación que no es constante en nuestra serie o bien como utilización del Succinil-Coenzima A en la síntesis de otros ácidos de cadena más larga (12). En el caso de la fenilalanina se demuestra que el esqueleto de éste ácido aromático no es aprovechable como fuente de energía cuando se ofrece a la *S. typhi* como única fuente de C.

El reporte de un acortamiento del ciclo de Krebs vía Isocitritasa (13) en que se pasaría de isocitrato a succinato y glioxalato cabría como posibilidad si el citrato fuese aprovechado en mayor proporción que la manifestada en las 4 cepas descritas.

Un factor a discutir en toda esta clase de experiencias es el relativo a las barreras de permeabilidad bacteriana o celular en general

nado no implica que éste penetre al interior de las células y por lo tanto que aunque existan los sistemas enzimáticos adecuados el sustrato puede dar resultados negativos respecto a su utilización. En nuestra serie se trabajó con moléculas sencillas y aunque se ve que la más pequeña (piruvato) fue la única oxidada, las demás no son mucho más complejas: vgr. succinato y alfa-cetoglutarato o glutamato. El que nuestras bacterias no hayan sido lavadas exhaustivamente y no se hayan removido los aminoácidos y las sustancias azufradas que se han descrito como interferencias potenciales de la permeabilidad bacteriana (14,15) tendría que haberse reflejado en una interferencia uniforme hacia todos los sustratos y no solamente hacia los sustratos de mayor peso molecular que el piruvato: un argumento adicional de que hubo sustancias extrañas, son los valores bajos de respiración endógena observados en nuestras mediciones.

La variabilidad en la conducta de las cepas puede explicarse en base a las observaciones de Shrivastava (4,5) y de Baron (16) quienes reportan grandes variaciones en el poder oxidante hacia sustratos como L-glutamato y L-tirosina en función del contenido en antígeno Vi de las cepas utilizadas. Los que poseen más antígeno Vi muestran consumos mayores de O_2 (Vi I de Bhatnagar y Watson V) en tanto que las H-901 y 0-901 casi no utilizan los aminoácidos mencionados; aunque todas nuestras cepas poseían antígeno Vi, todas estaban a su vez en fase V W (sin que se haya podido determinar las proporciones relativas de los diferentes antígenos) por lo cual es de esperarse que su posible variabilidad en las concentraciones antigénicas presentes se haya reflejado entre otros factores en una diferente conducta metabólica hacia los sustratos en cuestión.

La acción de la cloromicetina a concentraciones de 100 μ g/ml. de suspensión bacteriana es muy aparente en el caso de la oxidación del piruvato en donde puede suponer más del 50% del total de O_2 consumido y en los demás sustratos hubo interferencias menores o las diferencias no fueron de tomarse en cuenta dada la pequeña magnitud de los consumos de O_2 en las bacterias sin antibiótico. Esta acción de la cloromicetina no tiene antecedente previo en la bibliografía ya que en las acciones descritas para este antibiótico se han reducido a:

a.—Interferencias en las génesis de enzimas de adaptación en células no-proliferantes (17).

b.—Inhibición parcial de algunas esterasas bacterianas y de mamíferos (8).

c.—Inhibición de la oxidación de aminoácidos aromáticos y succinato en *Pseudomonas aeruginosa* (9,17) y *Pseudomonas fluoresces* y

d.—Alteraciones en la capacidad desaminante oxidativa de algunas aminas aromáticas de algunas microbacterias (18).

La oxidación del piruvato en bacterias que utilizan el ciclo de Krebs como *Pseudomonas fluorescens* no es afectada en tanto que la utilización de los metabolitos del ciclo propiamente dicho tales como succinato, alfa-cetoglutarato, fumarato y malato es afectada profundamente aun a concentraciones de 50v/ml. (19), parece lógico pensar que los bloqueos de la clorocinetina son a niveles enzimáticos diferentes y que con los datos expuestos no estamos en capacidad de proponer más que tentativamente que si se verifica una descarboxilación oxidativa del piruvato la interferencia se realiza en las etapas siguientes ya que el bloqueo previo implicaría una inhibición constante de un 100% de la utilización oxidativa de dicho sustrato.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el consumo de O_2 en 11 cepas de *Salmonella typhi* con antígeno Vi y en fase V W en presencia de piruvato, citrato, alfacetoglutarato, succinato 1-glutamato y 1-fenilalanina en cantidades que variaron de 3.4 a 9.1 μM /ml de suspensión bacteriana.

Las bacterias fueron capaces de consumir oxígeno en el caso del piruvato, en proporción de 1 μM de O_2 μM de sustrato; en el resto de los sustratos, los consumos fueron mucho menores y ocasionales (la mitad más o menos de las cepas en estudio).

La cloromicetina a dosis de 100 μg /ml. de suspensión bacteriana (10 mg. de bacterias secas/ml.) produjo inhibición de más del 50% (promedio) en la oxidación del piruvato.

Se sugiere que la *Salmonella typhi* no aprovecha el ciclo de Krebs como ruta metabólica natural y que la cloromicetina en el caso de una dismutación oxidativa del piruvato, inhibe la oxidación ulterior del acetato producido.

La variabilidad en la capacidad oxidativa demostrada por las diferentes cepas ante los mismos sustratos se piensa pueda deberse a las cantidades variables de antígeno Vi presentes en dichas cepas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—SEVAG, M.G. y MILLER, R.E.—Studies on the effect of immune reactions on the respiration of bacteria. I. Methods and results with *Ehbertella typhosa*. J.Bact.54:381-392, 1948.
- 2.—DIECKHUES, B. — Untersuchungen über die Reduktion von Farbstoffen durch *S. typhi*, *S. paratyphi* und *E.coli* Zent. Bakt 163:1-6, 1955
- 3.—GOES, P. DE, PROUVOST-DANON, A., y CIRIBELLI-GUIMARAES, J.—Acado dos anticorpos especificos sobre a atividades de hidrogenase de bacilo tifico. An. Microbiol. 2:63-69, 1952-1953.
- 4.—SHRIVASTAVA, G.C. AGARWALA, S.C., y BHATNAGAR, S.S — Antigenicity and enzyme activity of *Salmonella typhosa* Experimentia 9:421-422, 1953.
- 5.—SHRIVASTAVA, G. C., ARORA, K. L. y BAHTNAGAR, S. S.—Aryl sulphatase activity in *Salmonella typhosa*. Experimentia, 10, 493, 1954
- 6.—CAPELLATO, M —Attività fosfatásica negli schizomiceti. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 22:89-91, 1946.
- 7.—HAHN, F.E. y WISSEMAN, C.L.—Inhibition of adaptative enzyme formation by antimicrobial agents. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 76:533-535, 1951.
- 8.—SMITH, G. N., WORREL, C.S. y SWANSON, A. L.—Inhibition of bacterial esterases by chloramphenicol (chloromycetin) J. Bact. 58:803-809, 1949.
- 9.—BERNHEIM, F. y DE TURK, W.E.—The effect of chloramphenicol and certain other drugs on the oxidation of aromatic aminoacids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Pharmacol. & Exp. Therap. 105:246-251, 1952.
- 10.—UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. y STAUFFER, J.F.—“*Manometric Techniques and Tissue Metabolism*”. Burgess Pub. Co. Minneapolis, 1951.
- 11.—DIXON, M.—“*Manometric Methods*”. Second Edition, Mac Millan, New York, 1943.
- 12.—OCHOA, S.—Enzymic mechanisms in the citric acid cycle. Tomado de “*Advances in Enzimology*” Volumen XV Interscience Publishers, Inc. New York, 1954.

- 13.—CAMPBELL, J.J.R., SMITH R.A., & EAGLES, B.A.A.—Deviation from the conventional tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonasa aeruginosa* Biochim. et Biophys. Acta. 11:594, 1953.
- 14.—BERNHEIM, F., & DE TURK, W. E.—Factors which affect the oxidation of benzoic acid by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 65:65-68, 1953.
- 15.—DE TURK, E.W.E.—The effect of some sulfur-containing compounds on nitrogen assimilation by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 68:289-292, 1954.
- 16.—BARON, L. S.—Enzymic activities of Vi strain of *Salmonella typhosa* and their W variants. Experientia. 11:268-269, 1955.
- 17.—KUSHNER, D.J.—The action of chloramphenicol on the oxidation of succinate and related compounds by *Pseudomonas fluorescens*. Arch. Biochem. & Biophys. 58:332-346, 1955.
- 18.—OWEN, C.A., KARLSON, A.G., & ZELLER, E.A.—Enzymology of tubercle bacilli and other mycobacteria. V. Influence of streptomycin and other basic substances on the diamine oxidase of various bacteria. J. Bact. 62:53-62, 1951.

