



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Multiplicación en estado integrado y efecto protector frente a la irradiación ultravioleta del factor S de citrobacter intermedium C3

Ricardo Guerrero Moreno



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

RICARDO GUERRERO

MULTIPLICACION
EN ESTADO INTEGRADO
Y EFECTO PROTECTOR
FRENTE A LA IRRADIACION ULTRAVIOLETA
DEL
FACTOR S
DE
C. INTERMEDIUM C₃

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

1970



ANTONIUS A LEEUWENHOEK

Regia Societatis Londinensis
membrum.

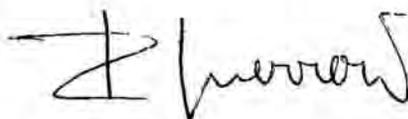
Verkolje sculp.

A. J. 1703

MULTIPLICACION EN ESTADO INTEGRADO
Y EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA IRRADIACION
ULTRAVIOLETA DEL FACTOR S DE CITROBACTER
INTERMEDIUM C 3

Memoria redactada para optar al grado de Doctor de Ciencias, Sección Biológicas, por la Universidad de Barcelona por

Ricardo Guerrero Moreno



calle Rosellón, 104-7º2ª
BARCELONA, -15

Vº Bº
El Director de la Tesis



Dr. Ramón Parés Farrás
Catedrático de Microbiología
Director del Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias, Universidad de Barcelona

Barcelona, 15 de julio de 1970.

A cuantos
en la escuela y universidad
me han comunicado sus conocimientos
y aportado su afecto:
a todos los maestros que me han enseñado.

P R E S E N T A C I O N

La interacción entre los hechos y las ideas ha caracterizado el continuo progreso científico de los últimos cuatro siglos. En biología esta interacción se hace aún más patente, dado que la naturaleza compleja de los fenómenos vitales requiere una inmediata interpretación de los hechos experimentados.

En la presente memoria se exponen diversos datos experimentales obtenidos a lo largo de varios años de investigación, junto con las ideas que han sugerido. El conjunto de trabajos que se describen a continuación forma parte de una de las líneas de investigación que se han desarrollado en equipo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona.

Los resultados que van a discutirse son fenómenos estadísticos, consecuencia de la integración de la actividad de millones de microorganismos. A través de ellos, y por un método necesariamente indirecto, se ha tratado de inferir la actividad de cada individuo.

No debemos olvidar que diversos mecanismos individuales darían un mismo comportamiento estadístico. Solamente después de una continuada compenetración de lógica y experimentos se ha podido llegar a la elaboración de unos modelos que se fundamentan en esa misma continuidad ininterrumpida, que hace que cualquier otra posibilidad no sea tan verosímil.

El trabajo experimental descrito en la presente memoria se inició en el mes de octubre de 1965, al integrarnos en las actividades del Departamento de Microbiología. Éste estaba entonces en su primera fase de desarrollo, y la investigación se hallaba especialmente centrada en lo que al cabo de uno y dos años debería plasmarse en las tesis doctorales de J. Guinea y R. Clotet. De todas formas, no podía preverse el alcance que tomaría el análisis de la segregación de glutamato por C. intermedium C 3, ya que el descubrimiento de la heterogeneidad colonial era aún reciente y se estaba preparando la metódica para las pruebas de la fluctuación, cuyos resultados habíande ser tan fructíferos.

Durante estos años he tenido la oportunidad de vivir la investigación del Departamento con igual intensidad que la mía propia, por cuanto que el trabajo particular y el del

equipo se iban desarrollando paralelamente sin solución de continuidad.

El análisis de la segregación de glutamato por C. intermedium C 3 es un tema de investigación del Departamento de Microbiología cuya amplitud es mucho mayor que lo que pueda corresponder a una determinada tesis doctoral. El director de la tesis, Dr. R. Parés Farrás, ha realizado la función de director de un equipo de investigación en el que teníamos un especial y definido papel que llevar a cabo. Comenzando por unos concretos experimentos y abordando progresivamente una serie de problemas en los que la investigación iba tomando más personalidad. El mismo sistema se ha seguido en cuanto a la discusión y elaboración de resultados, que se iniciaron mucho antes de la redacción de la memoria definitiva, al preparar bajo su orientación comunicaciones, trabajos y sesiones de seminario. Debo agradecer al director de la Tesis su entusiasmo y comprensión mantenidos permanentemente a lo largo de innumerables horas de trabajo en el gabinete y laboratorio.

Agradezco también profundamente el apoyo y colaboración sinceros de todos los otros investigadores del Departamento de Microbiología, y en especial, por haber trabajado más íntimamente en su contacto, de los Dres. J. Guinea y S. Hernández y de la Sta. J. Valoix. A todos ellos debo por su constante ayuda a la par en el aspecto profesional y humano, tan necesarios en toda empresa científica, la realización del trabajo de la Tesis.

Durante el desarrollo de ésta hemos disfrutado de una beca de iniciación a la investigación del Patronato de Igualdad de Oportunidades, durante los cursos 1965-66 y 66-67, y de otra perteneciente al Plan de Formación de Personal Investigador de la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación, en el curso 69-70.

Finalmente, quisiera señalar que esta memoria no puede considerarse un epílogo de las investigaciones comenzadas en 1962 por R. Clotet, J. Guinea y R. Parés Farrás, sino una etapa más continuada por otros en el mismo Departamento, de tal modo que, y ese es mi deseo, en el momento de su lectura sea ya posible añadir muchos aspectos nuevos. Los experimentos más fructíferos no son aquellos que dan soluciones lapidarias, sino los que conducen a otras experiencias, introduciendo en nuevos campos de estudio.

M U L T I P L I C A C I O N E N E S T A D O
I N T E G R A D O
Y
E F E C T O P R O T E C T O R F R E N T E A
L A I R R A D I A C I O N U L T R A V I O L E T A
D E L F A C T O R S D E
C I T R O B A C T E R I N T E R M E D I U M C 3

1. EL FACTOR DE SEGREGACION DE GLUTAMATO (FACTOR S) DE <u>CITROBACTER INTERMEDIUM C 3</u>	
1.1 Segregación de aminoácidos como desregulación metabólica	Pág. 1
1.2 El factor S como determinante genético ...	4
1.3 Carácter episómico del factor de segregación	7
1.4 Plan de trabajo '	11
2. INDIVIDUALIZACION DEL FACTOR S	
2.1 Análisis de la población en <u>Micrococcus gluta-</u> <u>micus</u>	16
2.2 Análisis de la población en coliformes del gru- po intermedio	44
3. LOCALIZACION DEL EFECTO DESREGULA- DOR	53
3.1 Modelo bioquímico del efecto del factor S ...	53

3.2 Fenocopia producida por el α -cetoglutarato	Pág.	57
3.3 Utilización del citrato como única fuente de carbono		60
3.4 Disociación colonial inducida por el citrato		61
3.5 Sustitución de la glucosa por otros intermedios del ciclo del ácido cítrico		83
3.6 Sustitución de la glucosa por otras fuentes de carbono y energía		97
3.7 Discusión y conclusiones		109
4. EFECTO PARADOJICO DEL ANARANJADO DE ACRIDINA		112
4.1 Eliminación de plásmidos con anaranjado de acridina		112
4.2 Efecto del anaranjado de acridina sobre la transferibilidad epidémica y la probabilidad de integración precoz		115
4.3 Material y métodos		118
4.4 Influencia del tamaño de la población inicial y del número de generaciones		122
4.5 Análisis de los resultados		127
4.6 Integración del factor S		131
4.7 Obtención de poblaciones con distinta frecuencia de elementos segregadores		133
5. IRRADIACION ULTRAVIOLETA Y RESTAURACION		143
5.1 Episomas y lesión fotoquímica del ADN ...		143
5.2 Material y métodos		146

5.3 Efecto del factor S sobre la susceptibilidad a la irradiación ultravioleta	Pág. 153
5.4 Fotorreactivación	158
5.5 Reactivación negra	165
5.6 Análisis colonial de las poblaciones irradiadas	173
5.7 Discusión y conclusiones	183
6. RESUMEN	203
7. CONCLUSIONES	222
8. BIBLIOGRAFIA	227

Παῦροι γάρ τοι παῖδες ὅμοιοι πατρὶ πέλονται
οἱ πλέονες χαχίους, παῦροι δέ τε πατρὸς ἀρείους

Contados son los hijos que se asemejan a sus padres,
los más salen peores y tan solamente algunos los aventajan.

Odisea; II, 276-7

I. EL FACTOR DE SEGREGACION DE GLUTAMATO (FACTORS) DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3

1.1 SEGREGACION DE AMINOACIDOS COMO DESREGULA- CION METABOLICA.

El fenómeno de segregación de aminoácidos por Citrobacter intermedium C 3 fue estudiado inicialmente y durante un tiempo relativamente largo, como una propiedad de esta cepa semejante a la de otras cepas bacterianas descritas en la literatura, capaces de acumular una cantidad considerable de uno o varios aminoácidos en el medio durante su desarrollo, bajo unas condiciones definidas de cultivo.

Aunque las primeras referencias de liberación de algunos aminoácidos durante el desarrollo bacteriano son muy antiguas, el estudio sistemático de dicho fenómeno se llevó primeramente a cabo durante la década 1950-60, tomando como objetivo fundamental la producción industrial de aminoácidos de interés económico. Los trabajos de ASAI et al. (1957) y de KINOSHITA et al. (1957) se consideran fundamentales a este respecto.

Es realmente cierto que cuando en 1960 PARES y CLOTET inician la prospección de bacterias que acumulan aminoácidos en el medio, lo hacen con la intención de aislar eventualmente un microorganismo superproductor. Sin embargo, su método de trabajo se basa fundamentalmente en dejar bien delimitado el mismo fenómeno de segregación, utilizando el amoníaco como única fuente de nitrógeno en un medio muy simple y eliminando toda posibilidad de un origen autolítico para la fracción amínica soluble. De este modo, se alentaba al mismo tiempo la posibilidad de encontrar un sistema metabólico en el que la regulación de la síntesis de aminoácidos difiriese marcadamente de la regulación normal. Con ello se tendría el material adecuado para establecer la naturaleza precisa de estas diferencias, a través de las cuales podría quizá llegarse a un mejor conocimiento de los mecanismos normales de regulación.

Probablemente era la primera vez que el fenómeno de la superproducción y pérdida de gran número de subunidades de la síntesis proteica se consideraba como resultado de una alteración profunda del metabolismo. En ésta debían estar implicados: a) un cambio a través de definidos procesos bioquímicos y b) unos factores genéticos determinantes. Puede ser interesante consignar a este respecto que por el mismo tiempo en el que se iniciaron estos trabajos habían tenido lugar las primeras publicaciones de JACOB y MONOD sobre la teoría del operón (1961) y de JACOB y WOLLMAN sobre episomas (1958); las cuales, evidentemente, no se tuvieron en cuenta, pero que resultarían extraordinariamente conecta

das con el desarrollo ulterior del análisis de la segregación de glutamato en C. intermedium C 3. Al parecer, se tuvo el acierto de abordar el problema de la segregación de aminoácidos con un enfoque que caería enteramente dentro de uno de los campos de ideas más fructíferos del actual desarrollo de la genética microbiana y de la biología molecular. 1.1

Las ideas anteriores saltan particularmente a la vista cuando se leen ahora de nuevo las tesis doctorales de GUINEA (1966) y de CLOTET (1967). Esta última recoge principalmente todo el arduo trabajo previo en el que queda definido el proceso de producción directa de aminoácidos por C. intermedium C 3. En su forma totalmente elaborada y completa, esta fase de la investigación se reúne mejor en CLOTET, GUINEA y PARES (1968).

Si bien la idea de desregulación, o regulación anómala, es una idea primaria, sólo se tomó conciencia del determinante genético implícito al examinar el sorprendente descubrimiento de la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3, después de la autobiografía directa con la cepa auxotrofa P 60 de Leuconostoc mesenteroides, glutamato dependiente (GUINEA, 1966 y 1970).

1.2 EL FACTOR S COMO DETERMINANTE GENETICO

El descubrimiento de la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 constituye un punto clave en el desarrollo de la investigación de la segregación de aminoácidos por dicha bacteria.. El análisis colonial con L. mesenteroides P 60 fue llevado a cabo por GUINEA en 1965. No se tiene noticia de ningún precedente de este resultado con relación a la segregación de aminoácidos ni de otro tipo de producto, si bien la heterogeneidad colonial es un fenómeno conocido desde el siglo pasado en cuanto a característica morfológica de las colonias. Es interesante señalar lo anterior dado que el método de la autobiografía directa con auxotrofos ha sido utilizado independientemente por otros autores con anterioridad (UDAKA, 1961). Es posible que la presencia de colonias con y sin aminoácido acumulado a su alrededor se haya presentado de hecho. Pero al parecer, si esto ocurrió, fue considerado consecuencia de un cultivo no puro y, probablemente, el subcultivo ulterior obtenido de la colonia segregadora no se sometió a nuevo análisis colonial.

Por otra parte, la experiencia cosechada hasta el presente con respecto al análisis colonial de aminoácidos, pone de manifiesto que la segregación de glutamato a nivel colonial por C. intermedium C 3 y su correspondiente detección por L. mesenteroides P 60 en agar-M 1 constituyen

un caso especialmente favorable para la diferenciación. 1.2 La cepa C 3 de C. intermedium segrega glutamato y alanina (CLOTET, GUINEA y PARES, 1969) y, en principio, el análisis colonial puede practicarse indistintamente para cualquiera de los dos aminoácidos. Aunque el análisis colonial para la segregación de alanina ha dado resultados coincidentes con los de glutamato, éstos son mucho menos precisos, y difícilmente podían constituir la base del análisis genético llevado a cabo a partir de ellos (HERNANDEZ, 1968 y 1970).

PARES y GUINEA abordaron el problema de la heterogeneidad a través de la prueba de la fluctuación de LURIA y DELBRUCK (1943) para ensayar la posibilidad de que la referida heterogeneidad fuera consecuencia de la coexistencia de dos genotipos distintos, sg^+ y sg^- , en equilibrio dentro de la población. Para ello, una serie numerosa de cultivos iniciados a partir de 1 a 10 células procedentes de una colonia C mostrarían la verosimilitud de un cambio genético $sg^- \rightarrow sg^+$, como base elemental del fenómeno referido. Los resultados de la prueba de fluctuación fueron realmente importantes pues mostraron no sólo que dicho cambio existía y que tenía lugar de acuerdo con el modelo mutacional, sino que además ocurría con una probabilidad por célula y generación inusitada para una mutación.

Como señalaron PARES, GUINEA y CLOTET, (1965), si los dos genotipos sg^+ y sg^- son glutamato independientes, el cambio genético implicado debe referirse a un ge-

ne de acción reguladora. Por lo tanto, y desde entonces, 1.2 el problema de la segregación de glutamato por C. intermedium C 3 quedó ligado a una desregulación metabólica producida por un cambio genético definido.

El método del análisis colonial ha sido estudiado profundamente durante años en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona. Su primera versión se encuentra en GUINEA (1966), y una relación crítica y elaborada del mismo ha sido publicada por el mismo autor recientemente (GUINEA, 1970) HERNANDEZ llevó a cabo el análisis colonial de C. intermedium C 3 sobre agar-M 1 por autobiografía con Pediococcus cerevisiae ATCC 8081, auxotrofa alanina dependiente. A pesar de que la alanina es el aminoácido cuantitativamente más importante segregado por C. intermedium C 3 (CLOTET, GUINEA y PARES, 1969), los resultados obtenidos distan mucho de ser tan buenos como los anteriores, como se ha dicho previamente.

Esas experiencias, sin embargo, han sido suficientes para mostrar que la segregación de glutamato y de alanina constituyen un único fenómeno, (HERNANDEZ, 1968 y 1970). De acuerdo con el análisis de aminoácidos secuencial practicado por CLOTET, GUINEA y PARES (1969), el glutamato sería el primer aminoácido formado, y los demás serían resultado de la transaminación. Como señala URGELL (1970) es posible que de esta manera se palién los efectos de drenaje del ciclo del ácido cítrico.

A partir de los hechos referidos, se concluye que segregación de aminoácidos por C. intermedium C 3 es sinónimo de segregación de glutamato, y se considera que el único sistema genético operante es el que regula la formación del glutamato. 1.2

1.3 CARACTER EPISOMICO DEL FACTOR DE SEGREGACION.

Los resultados de la prueba de la fluctuación mostraron sin lugar a dudas que las células no segregadoras procedentes de una colonia que no acumulaba glutamato -denominada colonia C-, eran capaces de dar una descendencia segregadora. El cambio genético ocurría al azar, pero con una probabilidad extraordinariamente alta, del orden de 10^{-2} por célula y generación.

Como consecuencia de lo que se acaba de señalar se sometieron a análisis estas dos alternativas:

a) la velocidad de mutación se había determinado erróneamente debido a que las colonias que acumulaban glutamato a su alrededor -denominadas colonias A-, podían

estar originadas por células sg-;

1.3

b) el cambio genético $sg- \rightarrow sg+$ no era un fenómeno mutacional, sino una modificación genotípica de otro origen y de tipo infeccioso.

Por otra parte, el cambio recíproco debía de ser igualmente eficaz, por cuanto la descendencia de las formas $sg-$ se estabilizaba para una proporción de elementos $sg+$ —o mejor de colonias A después del análisis colonial— igual a la de la población de partida de la cepa original.

PARES y GUINEA utilizaron diversos métodos de cálculo de la velocidad del cambio $sg- \rightarrow sg+$, fundamentalmente a partir de los resultados de la prueba de la fluctuación (GUINEA, 1966; GUINEA y PARES, 1966). HERNANDEZ abordó de nuevo el problema en su tesis doctoral y llevó a cabo nuevos experimentos que permitieron precisar el referido valor. En el método utilizado se determinó la probabilidad de que una célula $sg-$ pudiera dar una colonia A bajo unas condiciones standarizadas de revelado con L. mesenteroides P 60. A partir de este dato puede calcularse la frecuencia de células $sg+$ en la población de la fracción de colonias A. De las frecuencias aparentes de los elementos segregadores en poblaciones con el mismo número de individuos y distinto número de generaciones, se puede calcular la velocidad a del cambio $sg- \rightarrow sg+$ por célula y generación, por lo menos, la velocidad promedio dentro de las primeras 10-15 generaciones. Se obtuvieron resultados que confirmaban el valor aproximado de 10^{-2} . Por lo tanto, el cambio genético

que hacía que una célula segregase glutamato no podía ex 1.3
plicarse de acuerdo con el modelo de una mutación conven
cional (HERNANDEZ, 1968).

Más tarde, se efectuaron experimentos com-
plementarios en los que se determinaba el número de ge-
neraciones necesario para llegar al equilibrio y la veloci-
dad \underline{b} del cambio retrógrado $sg+ \rightarrow sg-$. Para poblacio-
nes de partida de 1 a 10 células el equilibrio se encontra-
ba después de 8 a 10 generaciones y \underline{b} resultaba del mis-
mo orden que \underline{a} . Naturalmente, estas conclusiones no ex-
cluyen la posibilidad de que el equilibrio se alcance incluso
más rápidamente en poblaciones mayores, y de que el va-
lor hallado de \underline{b} resulte totalmente ficticio en el caso de que
 \underline{a} no sea constante.

Verificada la alta probabilidad del cambio gené-
tico $sg- \rightarrow sg+$, se examinó la posibilidad de que requiriera
un contacto directo célula-célula. Para ello se llevaron a
cabo experiencias en las que el contacto era impedido por
una continua agitación mecánica, encontrándose que el refe-
rido cambio dejaba de producirse. Los experimentos ante-
riores eran idénticos a los que habían permitido el cálculo
de \underline{a} y sólo diferían por la agitación. La probabilidad de
que una célula $sg-$ diera una colonia A se mantenía constan-
te, pero el valor de \underline{a} durante las primeras 15 generaciones
resultaba nulo.

También se realizaron otros experimentos en
presencia de anaranjado de acridina. En este caso, no só-

lo no tenía lugar el cambio de células no segregadoras a 1,3 segregadoras, sino que además aquéllas disminuían ostensiblemente su capacidad de dar una colonia A. Esto es, se obtenía un nuevo tipo de células sg-, mucho más estable que el original.

Ante los hechos referidos parecía claro que la propiedad de segregar glutamato se obtenía como consecuencia de la infección por un factor de tipo episómico. Sin embargo, una explicación completamente comprensible acorde con el modelo episómico exigía admitir que sólo se segregaban glutamato las células que tenían el episoma en estado integrado en el cromosoma bacteriano. Esto se infería tanto de que los elementos sg- podían pasar siempre a sg+ como de que después del tratamiento con anaranjado de acridina nunca quedaban completamente "curados". La diferencia establecida entre poblaciones sg- tratadas y no tratadas con el colorante sugería la posibilidad de un episoma múltiple en estado autónomo. Sin embargo, los resultados experimentales no eran suficientes para llegar unívocamente a esta conclusión, ya que igualmente podían explicarse por una población en todo caso heterogénea.

Se concluía así que C. intermedium C 3 era una cepa bacteriana que de algún modo mantenía fuertemente fijado un factor de tipo episómico. Este factor estaba sujeto a un complejo dinamismo que incluía un estado en el que condicionaba la segregación de glutamato, y otro en el que ésta no tenía lugar. En el paso reversible entre la forma segregadora y no segregadora intervenían la infección y

además la multiplicación plasmática y la integración cromosómica. 1.3

1.4 PLAN DE TRABAJO

El autor de esta memoria inició el trabajo de investigación sobre la segregación de glutamato por C. intermedium C 3 abordando un aspecto de tipo completamente general que no había sido tenido en cuenta hasta el momento. Se trataba de dar una respuesta adecuada a la pregunta de si la heterogeneidad colonial era un fenómeno común a las cepas bacterianas conocidas que tenían la propiedad de acumular en el medio durante el crecimiento uno o varios aminoácidos, de forma cuantitativamente importante. De este modo se realizaron las experiencias que hacen referencia al análisis de las poblaciones de Micrococcus glutamicus.

Otro aspecto interesante relacionado con la especificidad del factor S de C. intermedium C 3 era el relativo a la eventual capacidad de segregar glutamato de otros coliformes taxonómicamente afines a la cepa estudiada. La parte correspondiente a esta investigación llevaba también com

prendido otro objetivo, el cual consistía en obtener mate- 1.4
rial adecuado para una posible transferencia interespecífi-
ca del factor S.

Los dos puntos referidos representaban un ne-
cesario complemento a la totalidad del trabajo llevado a ca-
bo en el Departamento de Microbiología sobre C. interme-
dium C 3 , habida cuenta de que esta cepa había sido aisla-
da en el propio laboratorio. En esta misma línea transcurre
el programa relativo a la tercera parte del plan de trabajo.
Se sabía que la diferencia entre los elementos segregadores
y no segregadores no consistía en una distinta capacidad de
utilización del glutamato para la biosíntesis, pero no si podía
estar determinada por una diferente utilización de la glucosa.
Por otro lado, la etapa bioquímica diferencial se suponía pró-
xima a la formación del α -cetoglutarato pero no se había in-
dividualizado completamente.

La cuarta parte del programa de trabajo tiene
por objeto el estudio profundo del efecto del anaranjado de
acridina, sólo apuntado en los experimentos antes referidos
(1.3). Esta parte ocupa un lugar esencial en todo el traba-
jo consignado en la presente memoria y en muchos aspectos
ha permitido llegar a conclusiones totalmente inaccesibles an-
teriormente. Su objetivo general podría resumirse ahora co-
mo el de aportar una evidencia crítica de que la segregación
de glutamato por C. intermedium C 3 está ligada al factor S
en estado integrado, multiplicándose conjuntamente con el cro-
mosoma bacteriano.

La última parte del programa de trabajo tuvo 1.4 su origen en dos ideas básicas: a) encontrar alguna otra manifestación fenotípica del factor S y b) encontrar alguna nueva evidencia ligada a los dos estados bajo los que dicho factor puede multiplicarse. Resultó sugestivo desarrollarlas a través del estudio del efecto de la radiación ultravioleta, dado que podían completarse experimentos relativamente sencillos y cuantificables, y que, además, durante el curso del trabajo aquí expuesto fueron publicadas las primeras evidencias de que los episomas pueden modificar profundamente la capacidad de restauración de las lesiones producidas en el ADN cromosómico por la radiación ultravioleta.

2.1	Análisis de la población en <u>Micrococcus glutamicus</u>	16
2.1.1	Producción microbiana de glutamato	16
2.1.2	Crecimiento de <u>M. glutamicus</u> en medios sin glutamato	22
2.1.2.1	Situación taxonómica de la cepa utilizada	22
2.1.2.2	Medio de mantenimiento	24
2.1.2.3	Medios para la producción de glutamato	26
2.1.3	Análisis colonial	29
2.1.3.1	Método del análisis colonial en <u>C. intermedium</u> C 3	29
2.1.3.2	Método del análisis colonial en <u>M. glutamicus</u>	32
2.1.3.3	Resultados	34
2.1.4	Discusión	41
2.2	<u>Análisis de la población en coliformes del grupo intermedio</u>	44
2.2.1	Cepas utilizadas	44
2.2.2	Condiciones de crecimiento	46
2.2.3	Resultados	47
2.2.4	Discusión	50

2. INDIVIDUALIZACION DEL FACTOR S.

La cepa C 3 de Citrobacter intermedium fue aislada después de la búsqueda deliberada de bacterias del agua y del suelo capaces de desarrollarse con amoníaco como única fuente de nitrógeno y dotadas de la propiedad de acumular aminoácidos en el medio después del crecimiento (CLOTET y PARES, 1962; CLOTET, 1967; CLOTET, GUINEA y PARES, 1968).

El presente capítulo está destinado a describir, por una parte, los experimentos relativos al estudio comparado de Citrobacter intermedium C 3 con Micrococcus glutamicus ATCC 13032, especialmente en relación al problema de la heterogeneidad colonial presentada por la primera y, por otra, a los resultados de la aplicación del método del análisis colonial a una serie de cepas de coliformes taxonómicamente afines a C. intermedium C 3.

El objeto que se persigue es el de encontrar alguna respuesta a las dos cuestiones siguientes: a) si el fenómeno de segregación de aminoácidos de C. intermedium

C 3 es análogo o no al de otras bacterias productoras de aminoácidos, y b) si la referida propiedad es específica de la cepa o es común con otras cepas afines. Es evidente que ninguna de estas respuestas se halla implícita en las condiciones bajo las cuales fue aislada Citrobacter intermedium C 3.

2.1 ANALISIS DE LA POBLACION DE MICROCOCCUS GLUTAMICUS.

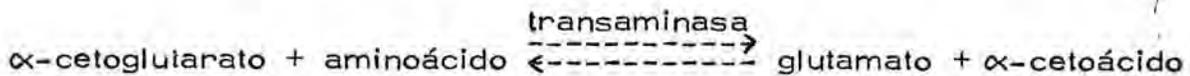
2.1.1 Producción microbiana de glutamato.

El hecho de que diversos microorganismos sean capaces de acumular aminoácidos en el medio de cultivo ha sido observado desde hace tiempo.

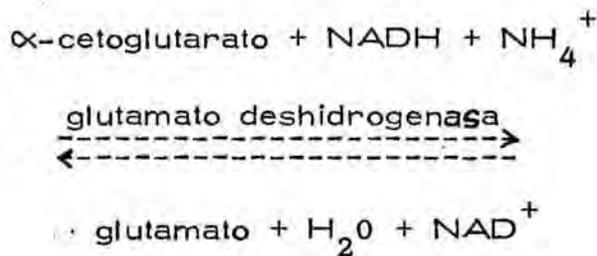
La transformación de un precursor al aminoácido correspondiente por acción microbiana fue estudiada primeramente por ADLER et al. (1938) en Escherichia coli, la cual podía segregar cantidades apreciables de glutamato al crecer en un medio con α -cetoglutarato. La acumulación directa del mismo aminoácido, sin otros aminoácidos y precursores preexistentes, fue señalada en E. coli y Aerobacter

aerogenes, que al crecer sobre un medio de glucosa y sales de amonio acumulaban histidina, aspartato, glutamato y alanina (DAGLER et al., 1950).

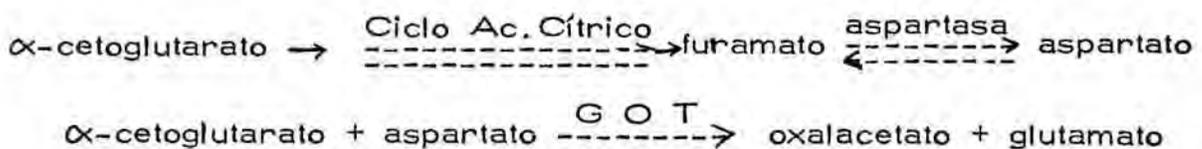
Diversas bacterias, entre otras algunas cepas de E. coli, Bacillus subtilis, B. anthracis y Pseudomonas fluorescens, producen glutamato a partir de un medio con α -cetoglutarato y aminoácidos donadores de $-NH_2$. El proceso de transaminación sería en esquema:



A partir de α -cetoglutarato también se puede obtener glutamato por aminación reductora:



Con una cepa de Pseudomonas ovalis puede obtenerse glutamato a partir de α -cetoglutarato y amoníaco, por una vía diferente, que comprendería ambos sistemas de aminación y no emplearía ninguna fuente orgánica de nitrógeno:



(GOT, Glutamato Oxalacetato Transaminasa; o bien, L-aspar_ 2.1.1
tato:2-oxaglutarato aminotransferasa, LOWENSTEIN,
1969).

El α -cetoglutarato es un producto que puede obtenerse por síntesis microbiana con varios organismos, por lo que puede producirse industrialmente glutamato a partir de azúcares y amoníaco a través de un proceso microbiológico doble (CLOTET y PARES, 1963).

La producción directa de glutamato a partir de glucosa y amoníaco se ha conseguido con varias cepas bacterianas, siendo la de mayor rendimiento la obtenida por KINOSHITA et al. (1957), Micrococcus glutamicus nov. esp. (KINOSHITA, 1958). La biosíntesis tiene lugar a través de la vía de las pentosas. El piruvato pasa a malato y el oxalacetato actúa de aceptor del acetil-CoA formando cítrato, que a través del ciclo del ácido cítrico da α -cetoglutarato (Figura 2.1).

La vía metabólica expuesta puede admitirse como muy verosímil, pero no sirve para explicar el fenómeno de la acumulación exterior de glutamato, ya que la misma puede actuar en muchos otros microorganismos sin que por ello sea segregado al exterior en cantidades apreciables. En dicho mecanismo bioquímico no se manifiesta justificación alguna por la cual deba producirse mayor cantidad de glutamato que la normal para soportar el desarrollo bacteriano (CLOTET, 1967).

(Vía de Embden - Meyerhof)

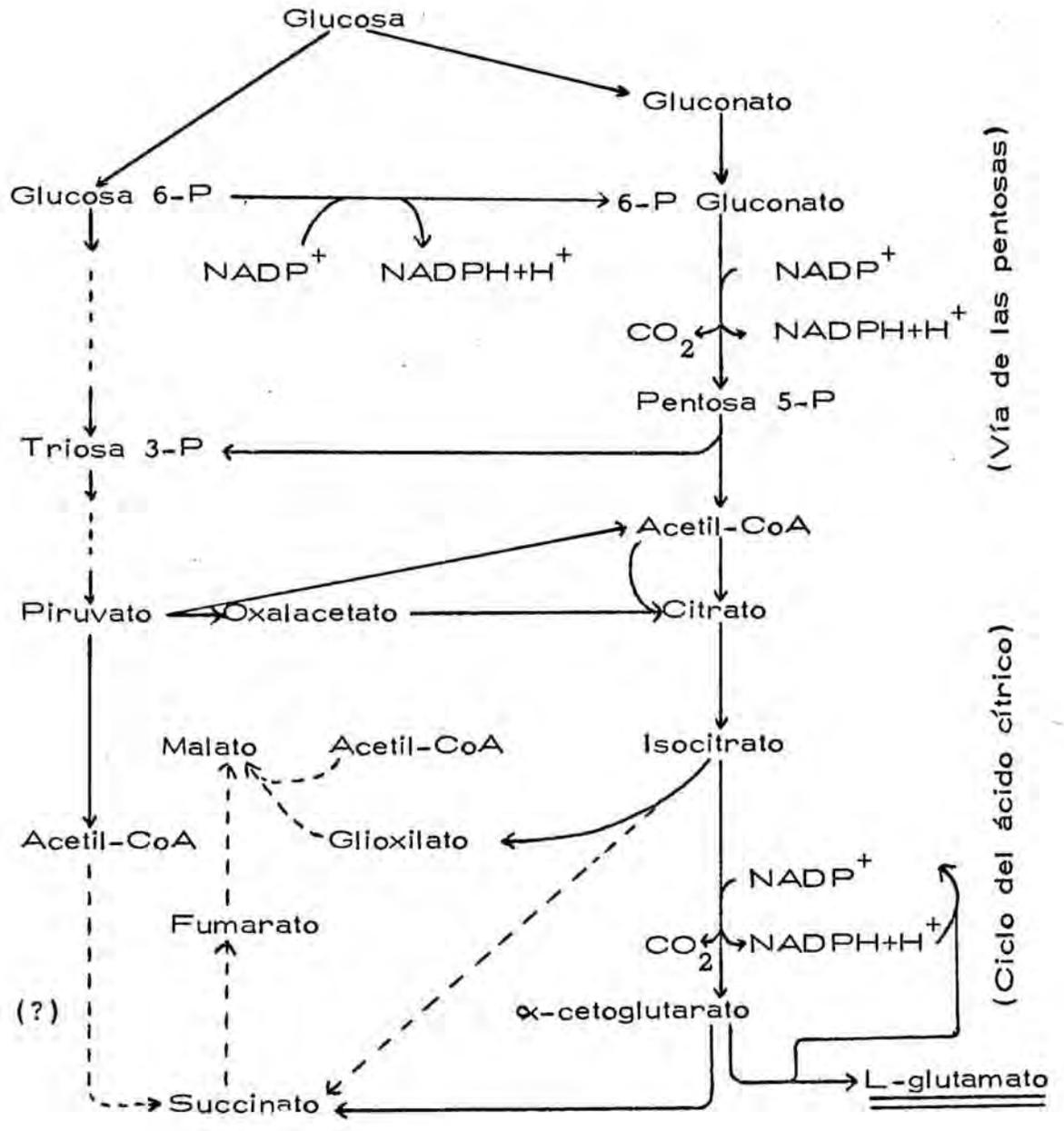


FIGURA 2.1 Vía metabólica de formación de glutamato en Micrococcus glutamicus. (Según KINOSHITA, 1963; p. 211).

Hasta ahora, el fenómeno de la producción bacteriana de aminoácidos se ha mirado como una propiedad común a todos los individuos que contiene la población de la cepa segregadora. Se sabe que algunas de estas cepas pueden variar considerablemente su rendimiento de producción, a partir de un mismo sustrato, lo cual tiene mucho interés desde el punto de vista de la producción microbiana de aminoácidos en gran escala. También se ha observado repetidamente que cultivos procedentes de una misma cepa original pueden aumentar o disminuir su capacidad de producción. En todos los casos estos hechos se han interpretado bajo el supuesto de una población homogénea. 2.1.1

La heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3, con respecto a la acumulación de glutamato, ha mostrado una posibilidad totalmente nueva dentro del problema general de la producción bacteriana de aminoácidos. La existencia de un equilibrio entre células segregadoras y no segregadoras permite considerar que el aumento o disminución de la cantidad de aminoácidos acumulados en el medio depende de la velocidad relativa de intercambio de ambos tipos celulares, además de la cantidad específica de aminoácidos segregada por célula (HERNANDEZ, 1968; HERNANDEZ y PARES, 1969).

El modelo episómico se ha mostrado especialmente adecuado para explicar tanto la heterogeneidad de la población de C. intermedium C 3, como el mantenimiento

de un equilibrio entre elementos segregadores y no segregadores. Por otro lado, sugiere la posibilidad de que la segregación de aminoácidos sea consecuencia de la presencia de un episoma en otros casos, sin que la población tenga que ser necesariamente heterogénea (PARES y GUINEA, 1969 b; URGELL, 1970).

Las ideas referidas mostraron la conveniencia de examinar el fenómeno de la producción bacteriana de aminoácidos en otros organismos distintos de C. intermedium C 3. Entre las cepas productoras descritas en la bibliografía se eligió una de Micrococcus glutamicus. Por una parte, esta cepa era fácilmente accesible puesto que es mantenida en colección por la American Type Culture Collection. Por otra, M. glutamicus segrega glutamato, aminoácido para el cual se ha verificado el análisis genético y bioquímico llevado a cabo hasta ahora sobre C. intermedium C 3 en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona. Finalmente, la referida cepa bacteriana es hasta hoy la de mayor producción específica de un aminoácido.

Es realmente verosímil que la cepa ATCC 13032 de Micrococcus glutamicus no sea exactamente la misma utilizada industrialmente para la producción de glutamato. Principalmente en relación al hecho de que esta última se hallará sujeta a una manipulación especial con objeto de mantener la máxima capacidad de síntesis, por lo menos en la preparación de los inóculos para la producción en gran escala. Aparte de ello, no se puede excluir la posibilidad de

que la cepa ATCC sea realmente distinta de otras cepas 2.1.1 de la misma especie citadas en la bibliografía.

2.1.2 Crecimiento de M. glutamicus ATCC 13032 en medios sin glutamato.

2.1.2.1 Situación taxonómica de la cepa utilizada -----

Se ha utilizado la cepa ATCC 13032 de Micrococcus glutamicus. Se hizo un cultivo inicial en agar nutritivo de un liofilizado que procedía directamente de la American Type Culture Collection. Durante la realización de los experimentos se mantuvo la cepa por resiembra sucesiva cada 24 h. en agar nutritivo inclinado a 30° C; en tales condiciones mostraba un crecimiento normal.

La cepa es un coco Gram positivo algo ovalado, de tamaño medio, 0,6-1,2 μ . Normalmente se observa en parejas, y éstas, a veces, unidas unas con otras formando cadenas cortas. También se aprecian formas aisladas.

El estudio taxonómico de la especie fue realizado primeramente por KINOSHITA et al. (1958) en diversas

cepas segregadoras de glutamato. Según KINOSHITA 2.1.1 esas cepas pertenecían al género Micrococcus, porque eran cocos Gram positivos, no esporulados y catalasa positivos. También tenían un pigmento amarillo pálido, eran aeróbicos estrictos y capaces de reducir nitratos. Además, no utilizaban las sales amónicas como única fuente de nitrógeno en el medio de Hucker ni licuaban la gelatina. Por todo ello, parecían próximas a M. aurantiacus y M. epidermidis. Sin embargo, las cepas en cuestión eran diferentes de estas otras en la forma de producción de ácido a partir de medios de leche o lactosa, y también en la pigmentación, reacciones serológicas y acumulación de glutamato. Por todo ello, KINOSHITA et al. (1958) propusieron el nombre de Micrococcus glutamicus nov. esp. para ese conjunto de cepas.

Posteriormente, el mismo KINOSHITA (1959 y 1960), después de un estudio más detallado, considera mejor colocar esas cepas en un nuevo grupo de la familia Corynebacteriaceae. La morfología de esas cepas varía ampliamente según la composición del medio de cultivo, desde la forma normal, ya descrita, hasta cadenas apretadas de cocos elipsoidales, que se tiñen dificultosamente con el azul de metileno -en un medio de 2 μg de biotina/ml.- hasta formas difteroides casi típicas, bien teñidas con azul de metileno -en un medio con 4% de citrato sódico (KINOSHITA, 1963; p. 208 y 209). La nueva clasificación sería así Corynebacterium glutamicum, denominación que aunque ya se ha venido empleando ocasionalmente (DEMAIN et al., 1967) no es la más utilizada, en la literatura. Por otra

parte, en el INDEX BERGEYANA (1966), sólo aparece 2.1.1 el M. glutamicus y por tanto ésta será la denominación adoptada en la presente memoria.

El descubrimiento de organismos capaces de segregar glutamato atrajo la atención de muchos microbiólogos industriales, que realizaron multitud de experimentos de prospección. El resultado ha sido una serie de microorganismos productores de glutamato, encuadrados bajo diversas denominaciones específicas nuevas, dentro de varios géneros como Brevibacterium y Microbacterium. Pero se puede demostrar que la mayor parte de esos organismos, al menos los que son buenos productores de glutamato, tienen muchos caracteres en común, y parecen ser idénticos a M. glutamicus o, como máximo, variantes de la especie. Esos caracteres son: 1) cocos o bacilos cortos, 2) Gram positivos, 3) aeróbicos, 4) no esporulados, 5) inmóviles, 6) requieren biotina como factor de crecimiento esencial, y 7) acumulan grandes cantidades de glutamato a partir de hidratos de carbono e ión amonio en cultivo aireado. (KINOSHITA, 1963).

2.1.22 Medio de mantenimiento -----

Para el cultivo y mantenimiento de la cepa, a partir del liofilizado, se probaron los siguientes medios:

1) Bacto-Lactobacilli Agar A.O.A.C. Difco
(N.0900) Leche peptonizada 15 g. Extracto de levadura 5 g.
Dextrosa 10 g. Jugo de tomate (100 ml) 5 g. KH_2PO_4 2 g

Tween 80 1 g. Agar 10 g.

2.1.1

II) Bacto-Micro Assay Culture Agar Difco (N.0319) Extracto de levadura 20 g. Proteosa peptona 5 g. Dextrosa 10 g. KH_2PO_4 2 g. Monooleato de sorbitan, 0,1 g. Agar 10 g.

III) Agar nutritivo Oxoid (N.CM 3) Extracto de carne 1 g. Extracto de levadura 2 g. Peptona 5 g. NaCl 5 g. Agar 15 g.

Para la incubación se ensayaron dos temperaturas 30 y 37° C. Aunque el óptimo para diversos Micrococcus es de 37° C (BERGEY'S 1957) a esta temperatura M. glutamicus crece muy poco. Su óptimo es 30° C, como ya comprobó KINOSHITA (1958).

Los resultados obtenidos (Cuadro 2.1.2.2) indicaron que la cepa podía mantenerse por resiembra sucesiva en agar nutritivo inclinado a 30° C.

CUADRO 2.1.2.2

CRECIMIENTO DE LA SIEMBRA POR ESTRIA EN
AGAR INCLINADO DE

MICROCOCCUS GLUTAMICUS

Temperatura	I) Lactobacilli A.	II) Micro Assay Culture A.	III) A. nutritivo.
30°	-	++	+++
37°	-	-	+

2.1.2.3 Medios para la producción de glutamato -----

Se buscó un medio que permitiera un buen crecimiento de M. glutamicus y que no fuera capaz de soportar por sí mismo desarrollo alguno de la cepa P 60 de L. mesenteroides. Para ello se ensayaron preferentemente medios minerales con glucosa, entre los que se incluyen algunos citados para el cultivo de M. glutamicus, (UDAKA, 1960). Sólo se han utilizado medios con nitrógeno orgánico cuando existía una garantía de la ausencia de glutamato.

I) Medio M I (GUINEA, 1966)

Glucosa 20 g. NH_4Cl 7 g. KH_2PO_4 1 g. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g. Agua 1000 ml. pH 7,2

I bis) Agar-M 1

El mismo M 1 con 1 % Bacto-Agar Difco (N.0140).

II) Medio de UDAKA

Glucosa 50 g. Urea 8 g. KH_2PO_4 0,5 g. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g. Agua 1000 ml. pH 7,2

III) Medio de UDAKA enriquecido

El anterior más 0,4 % de Glutamic Assay Medium.

IV) Bacto-Glutamic Acid Assay Medium Difco

-N. 0961.

(DIFCO, 1962 y 1963)

Bacto-dextrosa	50,0	g.	Biotina	0,000002	g.
Acetato sódico	40,0	g.	Acido fólico	0,00002	g.
Cloruro amónico	6,0	g.	DL-alanina	0,4	g.
Fosfato monopotásico	1,20	g.	Hidrocl.L-arginina	0,484	g.
Fosfato dipotásico	1,20	g.	L-asparaguina	0,800	g.
Sulfato magnésico	0,4	g.	L-cistina	0,100	g.
Sulfato ferroso	0,020	g.	Hidrocl.L-histidina	0,124	g.
Sulfato manganoso	0,040	g.	DL-iso-leucina	0,500	g.
Cloruro sódico	0,020	g.	DL-leucina	0,500	g.
Sulfato de adenina	0,020	g.	L-lisina	0,500	g.
Hidroc. guanina	0,020	g.	DL-metionina	0,200	g.
Uracilo	0,020	g.	DL-fenilalanina	0,200	g.
Xantina	0,020	g.	L-prolina	0,200	g.
Hidroc. tiamina	0,001	g.	DL-triptófano	0,080	g.
Hidroc. piridoxina	0,002	g.	L-tirosina	0,200	g.
Hidroc. piridoxamina	0,0006	g.	DL-valina	0,500	g.
Hidrocl. piridoxal	0,0006	g.	Acido L-aspártico	0,2	g.
Pantoneato cálcico	0,001	g.	DL-treonina	0,4	g.
Riboflavina	0,001	g.	DL-serina	0,1	g.
Acido nicotínico	0,002	g.	Glicina	0,2	g.
Acido p-aminobenzoico	0,002	g.			

100 g. de GAM dan 1,92 litros de medio final. (Se utiliza líquido o bien con agar al 2 %).

Los resultados obtenidos se expresan en el cuadro 2.1.2.3.

CUADRO 2.1.2.3

CRECIMIENTO DE MICROCOCCUS GLUTAMICUS EN
 MEDIOS SIN GLUTAMATO
 A LAS 24 H A 30° C

Medio	I) M 1	II) UD.	III) UD. enriq.	IV) GAM
Líquido	- ó +	+	+++	+++
Inclinado	+	+	+	+
Placa	-	-	+	+

- +++ Crecimiento abundante
- ++ Crecimiento suficiente
- + Crecimiento pobre
- Crecimiento inapreciable

Nota.- Debe señalarse que se hicieron siembras paralelas de Leuconostoc mesenteroides P 60 en todos los medios y condiciones indicados, comprobándose que no había el menor crecimiento observable en ninguno de los casos.

2.1.3 Análisis colonial.

Consiste en la determinación de glutamato acumulado alrededor de las colonias de M. glutamicus durante el crecimiento, mediante autobiografía directa con la cepa auxotrófica P 60 de Leuconostoc mesenteroides, glutamato dependiente. La técnica seguida se fundamenta en el método del análisis colonial utilizado para C. intermedium C 3 (GUINEA, 1966; HERNANDEZ, 1968; GUINEA, 1970).

2.1.3.1 Método del análisis colonial en C. intermedium C 3 -----

Es el método utilizado para el estudio de la heterogeneidad de la población de C. intermedium C 3 creciendo en M 1 (Vid. 1.1 y 2.1.2.3). Actualmente se practica con algunas modificaciones con respecto a la forma bajo la cual fue establecido por GUINEA (1966). La mayor parte de ellas han sido recogidas en un trabajo posterior del mismo autor (1970). Desde un punto de vista esquemático, y particularizando la técnica especialmente seguida para los resultados que se refieren en este capítulo, la marcha operatoria puede resumirse como sigue:

- 1/. Se parte de un cultivo de 24 h. a 30° C de C. intermedium C 3 (Vid. 2.2.1), en agar M 1 inclinado.
- 2/. Se practican diluciones sucesivas de un asa de la capa de crecimiento en Ringer 1/4.
- 3/. Se extienden 0,1 ml sobre placas de 10 cm de

diámetro con 10 ml de agar-M 1. Se eligen placas de fondo bien plano y se llenan colocándolas previamente en una superficie perfectamente horizontal. La dilución bacteriana se reparte cuidadosamente mediante una varilla acodada.

4/. Se incuban de 22 a 28 h. a 30° C. Generalmente las colonias empiezan a ser visibles a simple vista a las 16-18 h. Se escogen para el análisis únicamente las placas que tienen un número de colonias comprendido entre 5 y 30. Ocasionalmente, también las que presentan un número no muy distinto.

5/. La capa de crecimiento se cubre con 12 ml de una suspensión de L. mesenteroides en medio GAM con 1 % de agar.

5-1/. Leuconostoc mesenteroides P 60 es la cepa ATCC 8042 utilizada para la determinación microbiológica del glutamato (STEEL et al. 1949). Se mantiene en Bacto-Glutamic Inoculum Broth solidificado con un 1% de agar por resiembra sucesiva a 37° C. Este medio viene preparando por Difco (N.0963) y tiene los mismos componentes aunque con la mitad de la concentración, que el GAM (Vid. 2.1.2,3) más 20 mg/l. de ácido L-glutámico (DIFCO, 1962 y 1963).

5-2/. Para preparar la suspensión de L. mesenteroides se toman tubos de GIB-agar inclinado de 24 h. En un erlenmeyer se dispone un volumen de Ringer 1/4 correspondiente a 6 ml por placa a revelar y se inocula con un asa del crecimiento de L. mesenteroides por placa. La concentración de L. mesenteroides no es absolutamente crítica para el revelado. La suspensión se reparte en tubos de 6 ml. A cada uno de ellos se añade otro de 6 ml de GAM-agar que se han mantenido a 45-50° C en baño maría.

5-3/. El tamaño de las colonias de C. intermedium C 3 en el momento de iniciar el revelado es ligeramente inferior a 1 mm. o sea, que corresponde al campo microscópico de un aparato Wild M 20, con una combinación óptica de 10 x 10.

6/. Se incuba a 37° C 24-30 h. Durante este tiempo el tamaño de las colonias crece ligeramente, pero la población viable permanece prácticamente constante, 37° C es una temperatura desfavorable para el crecimiento de C intermedium C 3, y los tiempos de incubación pueden modificar sustancialmente el valor de la población viable de una colonia. Este hecho puede ser responsable de ciertas contradicciones en el número de individuos asignados a la población colonial de determinados tiempos de incubación cuando ésta es utilizada ulteriormente como inóculo. 2.1.3

7/. Ordinariamente se distinguen tres tipos de colonias, cuyo criterio de identidad es el siguiente:

Colonias A: halo bien visible a simple vista, que se difunde hacia los bordes. Existe un tipo de colonia A, super A, que presenta un doble halo, consistente en una zona anular interior sensiblemente más densa, seguida por otra exterior más tenue. Examinada al microscopio, a pequeño aumento, la colonia A presenta un borde limpio; a partir del cual se encuentran microcolonias de L. mesenteroides de diámetro decreciente a medida que se separan de dicho borde y con una densidad colonial muy grande.

Colonias B: halo apenas visible a simple vista, muy tenue o dudoso. El examen microscópico muestra colonias rodeadas de un número relativamente reducido de microcolonias de L. mesenteroides, de tamaño análogo al de las colonias A. Otro tipo de colonia B está rodeado de microcolonias mucho más pequeñas y con una densidad bastante menor que en las colonias A. No obstante, puede presentarse ambigüedad entre colonias A y B en algunos casos, sobre todo al examen microscópico.

Colonias C: desprovistas de halo por observación directa. El examen microscópico puede destacar microcolonias de L. mesenteroides periféricas muy pequeñas o bien ningún crecimiento en absoluto.

2.1.3.2 Método del análisis colonial en Micrococcus glutamicus ---

El método seguido es el mismo descrito en el apartado anterior. Se han utilizado los medios consignados en 2.1.2.3. Todos ellos requieren tiempos de incubación superiores a las 30 h, tomándose como punto de revelado el tamaño de la colonia. Sin embargo, y aun con tiempos de incubación mayores, también se han hecho revelados con diámetros de colonias más pequeños, con el fin de aumentar la resolución de la posible heterogeneidad.

Las condiciones de revelado, tiempo y diámetro de colonia, en M. glutamicus según los diferentes medios sin glutamato empleados se expresan en el Cuadro 2.1.3.2. Unos tiempos tan largos de incubación, 72-96 h, determinaban que el medio de las placas se deshidratase paulatinamente. Esta dificultad se solventó poniendo en cada placa 15 ml de medio, en vez de los 10 ml habituales.

La suspensión de L. mesenteroides se agita durante 10 min mediante un agitador magnético, con el fin de conseguir una dispersión bacteriana lo más completa y uniforme posible. Es muy probable que las colonias de tipo B con pocas microcolonias relativamente grandes pegadas sobre su superficie sea un artefacto debido a una dispersión inadecuada. Con M. glutamicus este inconveniente es mayor, ya que se dan con frecuencia grupos pegados a la colonia o incluso cubiertas en forma de mora, probablemente porque la concentración limitante de glutamato es ma-

yor, permitiendo el desarrollo de grupos como unidad.

La concentración de L. mesenteroides más apropiada es ligeramente inferior a la utilizada normalmente para C. intermedium C 3.

CUADRO 2.1.3.2

TAMAÑO DE LAS COLONIAS Y TIEMPO DE INCUBACION DE M. GLUTAMICUS Y C. INTERMEDIUM C 3 EN DISTINTOS MEDIOS

Cepa	Medio	Tiempo de incubación para alcanzar el tam. crítico	Tamaño crítico de revelado.
<u>M. glutamicus</u>	M 1	más de 96 h	0,6 mm ϕ
	de UDAKA	más de 96 h	0,6 mm ϕ
	de UDAKA enriq.	72 h	0,8 mm ϕ
	G A M	48 h	0,8 mm ϕ
	agar nutritivo	20-24 h	0,8 mm ϕ
<u>C. intermedium</u> C 3	M 1	24-30 h	1,0 mm ϕ

2.1.3.3 Resultados -----

El revelado de las colonias de M. glutamicus presentó algunas dificultades a causa del lento crecimiento de esta cepa en los medios sólidos utilizados. Tiempos de incubación muy superiores a 30 h ocasionan una amplia difusión del glutamato en zonas alejadas de las colonias, determinando un crecimiento extenso y difuso de L. mesenteroides y, por tanto, halos poco claros.

Debido a ello, sólo se utilizaron para el revelado las colonias crecidas en medio de UDAKA enriquecido y en GAM. Los tiempos de incubación a 30° C se reducían ligeramente si el inóculo había sido mantenido con anterioridad en el medio donde se quería revelar.

Se intentó también el revelado en agar nutritivo. Aunque las condiciones de tiempo de incubación y de tamaño eran muy parecidas a las empleadas con C. intermedium C 3, (Cuadro 2.1.3.2) los resultados no eran utilizables, pues L. mesenteroides crecía uniformemente por toda la placa -como era de esperar- aunque podía observarse que alrededor de las colonias el crecimiento era más denso.

Todas las colonias de M. glutamicus reveladas presentaban un halo denso, y por tanto debían equipararse a las colonias A de C. intermedium C 3 ya descritas. Los resultados de los diferentes revelados se esquematizan en el Cuadro 2.1.3.3.

El examen microscópico de distintas colonias demostró que todas ellas segregaban al medio suficiente cantidad de glutamato para soportar el crecimiento de microcolonias de L. mesenteroides que producían un halo claramente visible.

CUADRO 2.1.3.3

RESULTADOS DEL REVELADO DE LAS COLONIAS DE MICROCOCCUS GLUTAMICUS CRECIDO EN MEDIOS SIN GLUTAMATO

Medio	Placa nº	Tiempo de incuba. a 30 ° C	Tamaño al revelar	Total	Análisis colonial	
					Con halo	Sin halo
UDAKA enriq.	1	76 h	0,8 mm ϕ	41	41	0
	2	72 h	0,8 mm ϕ	23	23	0
	3	52 h	0,8 mm ϕ	35	35	0
G A M	4	48 h	1,0 mm ϕ	27	27	0
	5	48 h	0,8 mm ϕ	16	16	0
	6	44 h	0,8 mm ϕ	29	29	0
	7	36 h	0,8 mm ϕ	20	20	0

El acortamiento de los tiempos de incubación se debe al mantenimiento previo del inóculo en los medios sobre los que se efectúa el revelado.

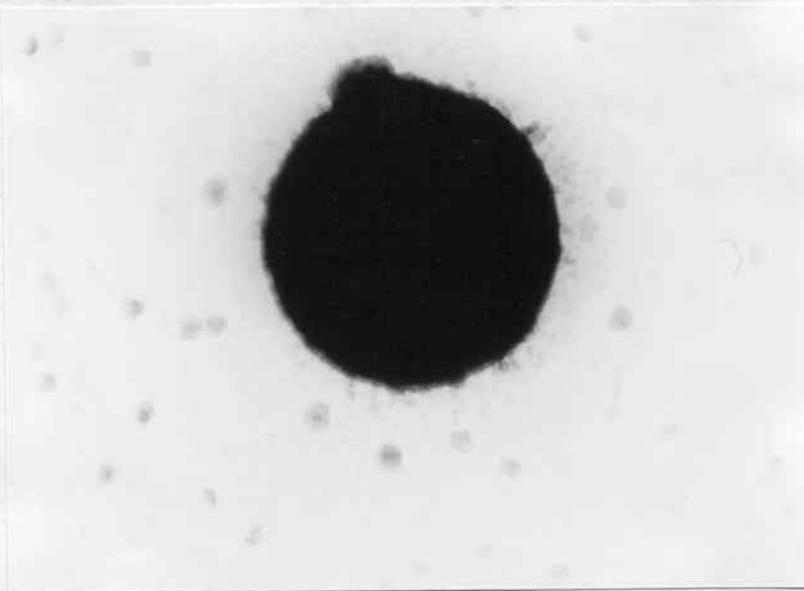
Aparentemente, los halos de las colonias obtenidas en una misma placa no eran uniformes, lo cual se confirmaba en el examen microscópico. Este resultado podría ser atribuido a cierta heterogeneidad en el diámetro de las colonias, que es bastante característico en el crecimiento en placas de Glutamic Assay Medium. Sin embargo, se sugirió la posibilidad de que no todas las colonias del mismo diámetro acumulasen igual cantidad de glutamato.

Con el fin de aumentar la resolución del análisis colonial de la segregación de glutamato se llevaron a cabo nuevos ensayos en los que se iniciaba el revelado cuando las colonias empezaban a ser perceptibles. De este modo, fue posible obtener en una misma placa colonias con y sin halo de Leuconostoc mesenteroides (Microfotografías 2.1 - 2.2 - 2.3 y 2.4 - 2.5).

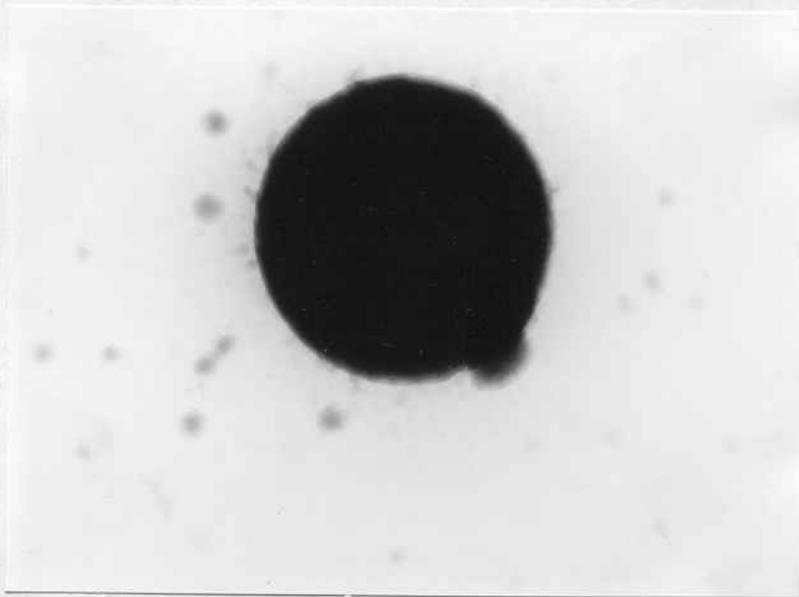
En realidad, como todas las microfotografías indicadas están hechas al mismo aumento y ampliación, las colonias que se ven desprovistas de halo son más pequeñas de diámetro. Pero en la Microfotografía 2.6 puede observarse el aspecto microscópico de otra colonia de la misma placa en la que el halo es mucho menor que en las 2.1, 2.2 y 2.3 en tanto que el diámetro es el mismo.

Los resultados referidos ponen de manifiesto que por el método de análisis colonial establecido con Leuconostoc mesenteroides P 60 no ha sido posible obtener una heterogeneidad colonial en Micrococcus glutamicus, al menos que pueda ser comparable a la estudiada en Citrobacter intermedium C 3. A pesar de ello, no se puede concluir que la segrega

ción de glutamato alrededor de las colonias de M. glutami-
cus sea uniforme, y los experimentos realizados sugieren
más bien que las diferencias a este respecto pueden signi-
ficar diferencias reales entre los individuos de distintas co-
lonias en cuanto a su propiedad de segregar glutamato.

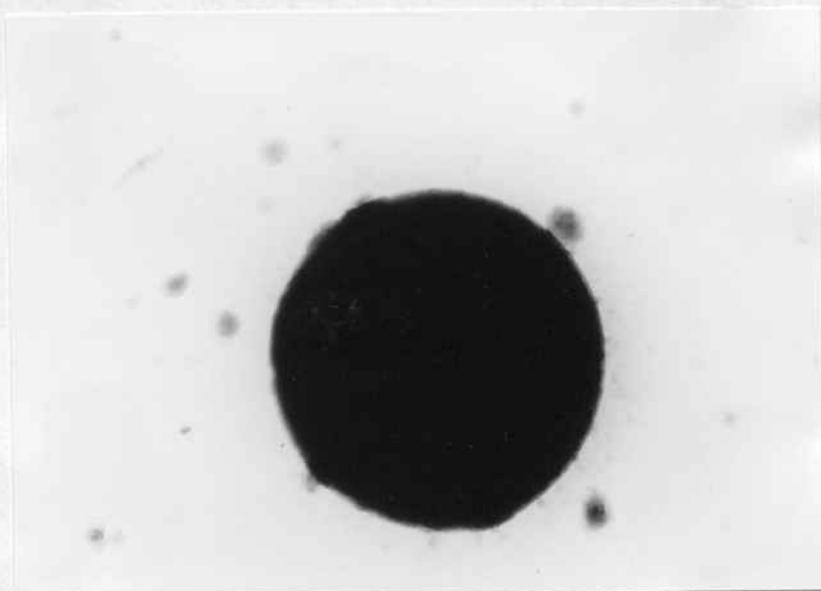


2.1

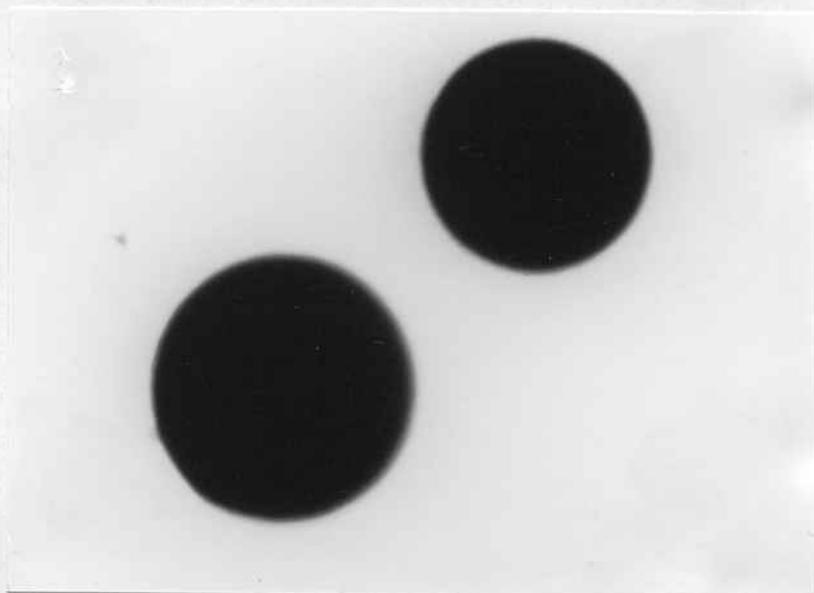


2.2

MICROFOTOGRAFÍAS 2.1 y 2.2 Colonias de M. glutamicus con diferente profusión de microcolonias de L. mesenteroides P 60 a su alrededor. (Combinación óptica: Wild; obj. Pl. fluotar 3x; oc. 10x).

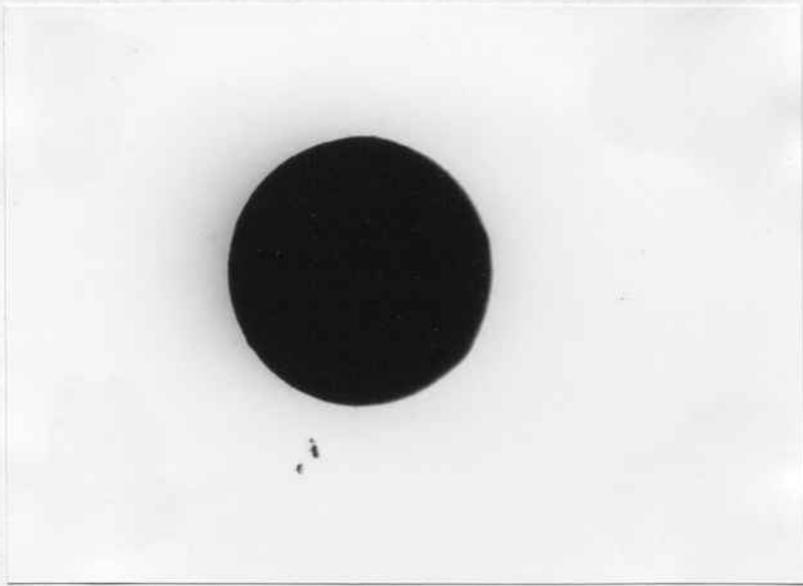


2.3

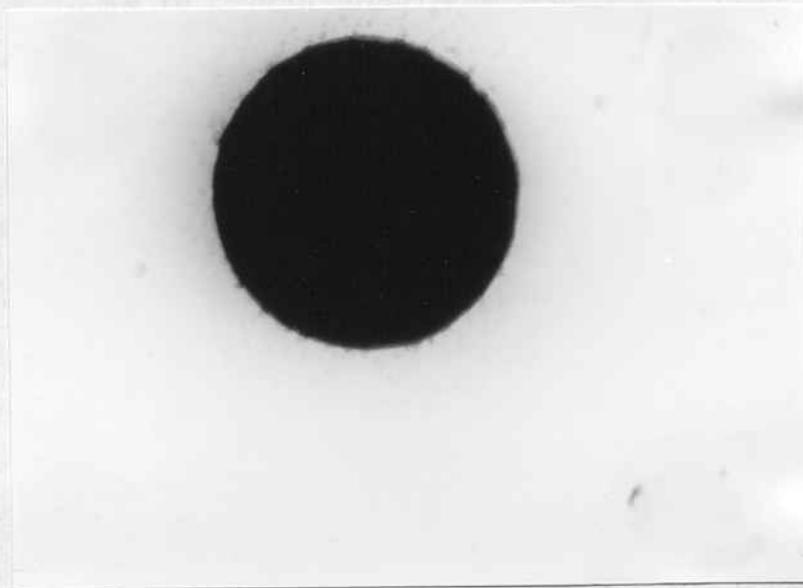


2.4

MICROFOTOGRAFIAS 2.3 y 2.4 Colonias de M. glutamicus pertenecientes a la misma placa. Puede observarse que las de 2.4 no presentan crecimiento de L. mesenteroides P 60, en parte debido a su menor diámetro.



2.5



2.6

MICROFOTOGRAFÍAS 2.5 y 2.6 Colonias de M. glutamicus con halos de crecimiento de L. mesenteroides P 60 muy tenues. La colonia de 2.6 es de igual tamaño que las de 2.1, 2.2 y 2.3 presentando, sin embargo, un halo mucho menor.

2.1.4 Discusión.

De acuerdo con lo señalado en el apartado 2.1.2, Micrococcus glutamicus no puede crecer en un medio mineral con glucosa sin la adición de biotina. Esto se sugiere del efecto de la adición de un 4 % de GAM al medio de UDAKA y de que los medios minerales citados en la literatura siempre llevan biotina (DEMAIN et al., 1967). La segregación de glutamato en M. glutamicus está influida por la concentración de biotina, la cual, a partir de determinado valor, disminuye la producción (KINOSHITA, 1959). Este efecto ha sido explicado por KINOSHITA como posible consecuencia de una doble vía metabólica que conduce a la producción de glutamato con distinto rendimiento y sobre las cuales tiene la biotina distinto efecto. Es interesante hacer notar que cualquier otro tipo de heterogeneidad dentro de la población podría dar razón del mismo hecho, con independencia de un mecanismo a nivel de cada célula. Por otra parte, SHIIO et al. (1962, 1963) y OTSUKA et al. (1965), lo atribuyen a un cambio en la permeabilidad celular, basándose en la semejanza de efecto con la penicilina G y el Tween 60, incluso cuando la biotina ha sido sustituida por ácido oleico.

Desde el punto de vista de los experimentos descritos en esta memoria, no es posible llegar a ninguna conclusión con respecto a la producción de glutamato. En cambio, parece que la biotina es un factor de crecimiento para la cepa utilizada de M. glutamicus. Realmente, los úni

cos medios de cultivo eficaces son aquellos que contienen biotina, y si bien no se ha ensayado la biotina sola en un medio mineral, hay referencias de medios de este tipo, como el utilizado por UDAKA.

Parece indudable que con M. glutamicus no se presenta un fenómeno análogo al de las colonias C de C. intermedium C 3. Sin embargo, los halos de crecimiento de la cepa P-60 difieren de una a otra colonia, hasta un punto difícil de comprender dentro de una población uniforme con respecto a la segregación de glutamato. Si en el mismo cultivo se encontrasen elementos segregadores y no segregadores, como ocurre en C. intermedium C 3, con una frecuencia alta de interconversión, el resultado obtenido podría ser consecuencia de una segregación específica más elevada. Esto sería un resultado análogo al encontrado por HERNANDEZ sobre la segregación de alanina - por C. intermedium C 3 (HERNANDEZ, 1968 y 1970). De todos modos, el resultado obtenido sólo es compatible con una heterogeneidad en la manifestación fenotípica, siquiera en el aspecto cuantitativo. Entonces es difícil poder encontrar un modelo distinto del de tipo episómico para dar cuenta de los hechos. No solamente existe una semejanza con respecto a la segregación de aminoácidos por C. intermedium C 3, sino también con relación a otros fenómenos diferentes que obedecen a mecanismos de este tipo, como las cepas - toxicogénicas de Corynebacterium y otras cepas bacterianas con una mutante defectiva en un profago. En estas últimas, se ha perdido la capacidad de producir fagos vegetativos, pero no la de comunicar propiedades a la bacteria que pueden sufrir un cambio de expresión cuando el genoma del fago es desreprimido. Es posible sugerir como conclusión general

en relación a los experimentos descritos en el presente 2.1.4 capítulo, que los mecanismos de segregación de aminoácidos pueden ser semejantes y en ambos casos de origen episómico.

La intervención de un ADN extraño en un fenómeno de segregación de aminoácidos constituiría una explicación comprensible de cómo puede ser estabilizada dentro de la población una desregulación metabólica tan importante, en conjunción con los hechos antes referidos.

El análisis anterior puede ser un punto de partida para una investigación ulterior del mecanismo genético de la segregación del glutamato en M. glutamicus.

2.2 ANÁLISIS COLONIAL DE LA POBLACION EN COLIFORMES DEL GRUPO INTERMEDIO.

2.2.1 Cepas utilizadas.

Se han utilizado las cepas siguientes:

<u>Citrobacter intermedium</u> C 3	C.C.B. 362
<u>Citrobacter intermedium</u>	A.T.C.C. 6750
<u>Citrobacter freundii</u>	A.T.C.C. 8090
<u>Citrobacter freundii</u>	A.T.C.C. 8454
<u>Citrobacter freundii</u>	A.T.C.C. 10053
<u>Paracolobactrum intermedium</u>	A.T.C.C. 11606

El género Citrobacter queda definido como un coliforme del grupo intermedio que produce una fermentación ácida-mixta de la glucosa, unido a la capacidad de utilizar el trato como única fuente de carbono (EDWARDS y EWING, 1964). Todas las cepas del género Citrobacter, incluyendo la C 3, fermentan rápidamente la lactosa a 30° C. Dentro del mismo grupo de coliformes intermedios se coloca el género Paracolobactrum, caracterizado por una fermentación de la lactosa muy lenta (EDWARDS y EWING, 1964), de 3-4 días en Paracolobactrum intermedium ATCC 11606.

C. freundii produce SH₂; C. intermedium -

ATCC 6750, P. intermedium ATCC 11606 y C. intermedium C 3 presentan una débil producción de SH_2 , en orden decreciente. En la última cepa sólo se oscurece ligeramente la picadura en el medio de Klieger. 2.2.1

Los coliformes del grupo intermedio están - constituidos por cepas muy heterogéneas y mal definidas taxonómicamente. Un estudio sistemático de las cepas referidas ha sido realizado por SANCHO en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, junto con otras cepas del mismo grupo - (SANCHO y PARES, 1969).

Citrobacter intermedium C 3 fue aislada en - 1961 por CLOTET (CLOTET y PARES, 1962). Su estudio taxonómico ha sido llevado a cabo por GUINEA (1966) y SANCHO y PARES (1969). Es un coliforme típicamente del grupo intermedio, que puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Habitualmente no produce SH_2 , pero, como en otros miembros de C. Intermedium, la picadura en el medio de Klieger se oscurece ligeramente. En - C. freundii la producción de SH_2 ennegrece totalmente el medio de Klieger y se detecta con facilidad con acetato de plomo. No obstante, las dos cepas de C. intermedium difieren considerablemente entre sí en otros aspectos.

Aparte de su morfología colonial en placas de - agar nutritivo o agar-M 1, las cepas C 3 y ATCC 6750 se distinguen porque la primera produce ácido y gas de la sacarosa, que no utiliza la segunda, la cual es además Eijkman positivo.

Las cepas de C. freundii difieren entre sí, 2.2.1
prescindiendo del aspecto del crecimiento, en la produc-
ción de indol, Eijkman, urea y fermentación de azúcares
La cepa ATCC 10053 es indol positivo, Eijkman positivo
y urea positivo. La ATCC 8090 sólo produce ácido de
la lactosa y presenta peptonización ácida de la leche.

2.2.2 Condiciones de crecimiento.

Los medios y temperatura de incubación para
llevar a cabo los experimentos de revelado con las distin-
tas cepas del grupo intermedio fueron los mismos que los
utilizados habitualmente con C. intermedium C 3. Estos me-
dios fueron agar-M 1 y Glutamic Assay Medium, ya descri-
tos (2.1.2.3). La temperatura de incubación fue de 30^o C.

El crecimiento en placas de agar-M 1 da unas
colonias regulares y redondas, similares a C. intermedium
C 3. Pero algunas de estas cepas no crecen en ese me-
dio tan bien como la C 3, y tardan en alcanzar el tamaño de
revelado, 1,0 mm, unas 34-36 h, como en el caso de C.
freundii ATCC 8454 y C. freundii ATCC 10053.

El revelado se ha realizado siguiendo la técni-
ca habitual (Vid. 2.1.3.1.) Todas las cepas del grupo in-
termedio ensayadas, a excepción de C 3, crecían con cier-
ta dificultad en agar-M 1 después de varias resiembras, por

lo que tuvieron que ser mantenidas en agar nutritivo, a 2.2.2
30° C, y pasadas a agar-M 1 en el momento de reali-
zar cada experiencia.

2.2.3 Resultados

El revelado se efectuó en las mismas condi-
ciones habituales. Desde el principio se observó que la
mayor parte de las colonias se levantaban, totalmente o -
por sus bordes, deshaciéndose parcialmente y determinan-
do la lisis de numerosas células, por lo que los revelados
no salían limpios. Los resultados obtenidos se expresan en
el Cuadro 2.2.3.

En algunas placas se observaron estrechos ha-
los alrededor de todas las colonias. Estos halos se interpre-
taron como resultado de la lisis de los bordes de las colonias
y, desde luego, no podía apreciarse diferencia importante de
tamaño o densidad de halo entre unas y otras colonias de la
misma placa.

Las cepas Citrobacter intermedium ATCC 6750
y Paracolobactrum intermedium ATCC 11606 son las que pre-
sentan condiciones de crecimiento sobre agar-M 1 más favo-
rables para el análisis colonial, si bien no manifiestan halo -
alguno de crecimiento de la cepa indicadora P 60, como an-

tes se ha señalado. No obstante, la consistencia de las .2.2.3
colonias es inferior a la de la cepa C 3, por lo que es
favorable mantenerlas una hora en la nevera antes de -
verter sobre la superficie de crecimiento la suspensión
de L. mesenteroides.

CUADRO 2.2.3

ANALISIS COLONIAL DE LA POBLACION DE DIVERSAS CEPAS DEL GRUPO INTERMEDIO

Cepa	Placa nº	Tiempo incub. 30º C y tama ño al revelar.	Análisis colonial		
			total	con halo	sin halo
<u>C. intermedium</u> ATCC 6750	1	30h : 1,2mm \emptyset	35	0	35
	2	id	43	0	43
	3	id	37	0	37
<u>C. freundii</u> ATCC 8090	1	32h : 1,2mm \emptyset	31	0	31
	2	id	22	0	22
	3	id	24	0	24
<u>C. freundii</u> ATCC 8454	1	36h : 1,2mm \emptyset	21	0	21
	2	id	28	0	28
	3	id	17	0	17
<u>C. freundii</u> ATCC 10053	1	34h : 1,1mm \emptyset	12	0	12
	2	id	8	0	8
	3	id	15	0	15
	4	id	8	0	8
<u>P. intermedium</u> ATCC 11606	1	30h : 1,1mm \emptyset	19	0	19
	2	id	10	0	10
	3	id	12	0	12
	4	id	18	0	18
	5	id	15	0	15
	6	id	22	0	22
	7	id	27	0	27

2.2.4 Discusión

Al parecer, sólo C intermedium C 3 puede considerarse como una cepa segregadora de aminoácidos. Aunque no se han hecho determinaciones directas de nitrógeno amínico en el medio durante el crecimiento en M 1, en las demás cepas no se presentan halos de crecimiento de Leuconostoc mesenteroides P 60 ó, cuando los hay, son suficientemente pequeños para atribuirlos a un fenómeno de autólisis. Por lo demás, en ningún otro caso se presenta una heterogeneidad colonial.

Después de lo observado en M. glutamicus - se sugiere la idea de que cierto grado de heterogeneidad colonial es inherente al fenómeno de segregación genuina de aminoácidos. Por lo tanto, halos pequeños y uniformes serían indicadores de ausencia de capacidad segregadora y resultado de la autólisis del borde de la colonia.

En realidad, sólo se ha ensayado la demostración de glutamato alrededor de las colonias, y por lo tanto existe la posibilidad de que alguna cepa fuera segregadora de otro aminoácido. Sin embargo, el glutamato acompaña casi siempre a los demás aminoácidos (KINOSHITA et al., 1957; PARES y CLOTET 1963), siendo su ausencia un buen indicio de la falta total de segregación. En la misma cepa C. intermedium C 3, se segrega simultáneamente alanina, aspartato y aminoácidos básicos, el primero en mayor proporción que el glutamato (CLOTET, 1967; CLOTET, GUINEA y PARES, 1969)

con L. mesenteroides permiten sugerir que no hay segregación de aminoácidos, tanto por la uniformidad del comportamiento colonial como por la misma ausencia o pequeñez del halo debido al glutamato.

Aunque la afinidad taxonómica de los miembros del grupo intermedio no está suficientemente demostrada, es muy probable que sea mayor que la que existe con respecto a otros géneros de Enterobacteriaceae. Por lo tanto, si el Factor S puede transferirse interespecíficamente, es muy probable que alguna de ellas constituya un material adecuado como receptor. En este sentido, Paracolobactrum intermedium ATCC 11606 parece especialmente aconsejable por la limpieza de las colonias, que en ningún caso dan crecimiento de L. mesenteroides. Este hecho ha sido independientemente confirmado por GUINEA en el mismo laboratorio, y fue el punto de partida para los experimentos de transferencia del Factor S, que alcanzaron particular éxito (RAMOS, GUINEA y PARES, 1968; PARES y GUINEA, 1969 a; GUINEA Y PARES, 1969). Esta cepa de Paracolobactrum intermedium con el Factor S procedente de C. intermedium C 3 ha sido también estudiada por URGELL (1970) en vistas al esclarecimiento del mecanismo bioquímico de la acción desreguladora que condiciona.

Después de los resultados referidos en el presente capítulo, la segregación de aminoácidos observada en C. intermedium C 3 aparece como una propiedad particular de dicha cepa. Independientemente, la segregación bacteriana de aminoácidos puede ser atribuida en otros casos a un mecanismo semejante.

3.1	Modelo bioquímico del efecto del factor S	53
3.2	Fenocopia producida por el α -cetoglutarato ...	57
3.2.1	Primeras observaciones sobre el efecto del α -cetoglutarato	57
3.2.2	Confirmación de la homogeneidad colonial en medios con α -cetoglutarato	58
3.2.3	Sustitución total de la glucosa por α -cetoglutarato	59
3.3	Utilización del citrato como única fuente de carbono	60
3.4	Disociación colonial inducida por el citrato	61
3.4.1	Tipos coloniales de <u>C. intermedium</u> C 3 ...	61
3.4.2	Frecuencia de colonias gigantes en la población de una colonia C y su variación a lo largo del cultivo	64
3.4.3	Influencia del tipo de población sobre la frecuencia de colonias gigantes	73
3.5	Sustitución de la glucosa por otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico	83
3.5.1	Succinato	84
3.5.2	Malato	
3.5.2.1	Revelado a tiempos variables de incubación a 30° C	88
3.5.2.2	Heterogeneidad colonial en M 1 y M 1-malato	89
3.5.2.3	Enumeraciones viables en M 1 y M 1-malato	93
3.6	Sustitución de la glucosa por otras fuentes de carbono y energía	97
3.6.1	Xilosa	98
3.6.2	Glicerina	101
3.6.3	Sorbitol	101
3.6.4	Piruvato	103
3.7	Discusión y conclusiones	109

3. LOCALIZACION DEL EFECTO DESREGULADOR.

3.1 MODELO BIOQUIMICO DEL EFECTO DEL FACTOR S

La diferencia entre los elementos sg^+ y sg^- no puede referirse a la mutación de un gene estructural. Ambos tipos celulares son capaces de formar glutamato, de acuerdo con su desarrollo en medios carentes de este aminoácido. Este hecho fue tenido en cuenta desde inmediatamente después de la observación de la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 (PARES, GUINEA y CLOTET, 1965).

En C. intermedium C 3 el glutamato se forma a partir del α -cetoglutarato por aminación reductora con NH_4^+ y NADH. Al parecer, la actividad glutamato deshidrogenasa no difiere entre los elementos sg^+ y sg^- , de acuerdo con las

El glutamato se halla presente en el "pool" celular, y pequeñas cantidades del mismo pueden escaparse al medio por difusión. En principio, no parece necesario considerar un mecanismo especial de segregación in dependiente del sobreacúmulo del glutamato en el "pool". Una parte del glutamato es tomada constantemente para la biosíntesis y las reacciones de transaminación, las cuales devuelven cetoglutarato al ciclo del ácido cítrico o lo utilizan de nuevo para bombear NH_4^+ del medio a las vías de síntesis proteica.

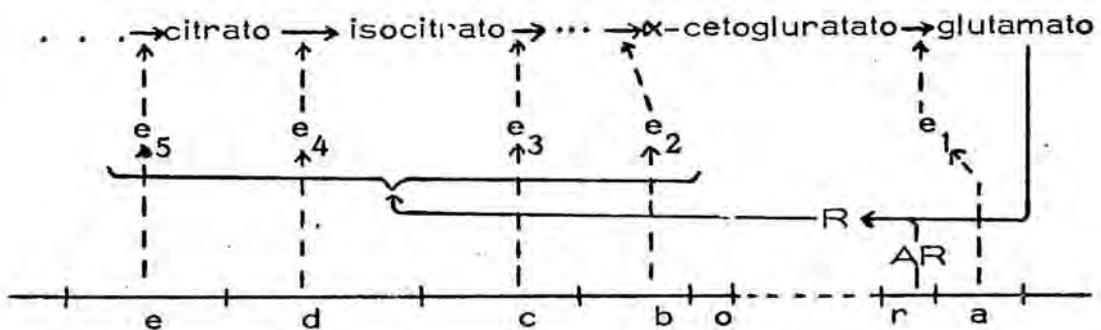
El sobreacúmulo de glutamato puede condicionar un exceso de otros aminoácidos en el "pool" celular, y ésta parece ser la causa de que junto al glutamato se se gregue también alanina y otros aminoácidos (CLOTET, 1967; CLOTET, GUINEA y PARES, 1968). Por otra parte, la alta concentración de glutamato puede ser condicionada por cualquiera de estas tres causas: 1a) incremento de la utilización de la glucosa, 2a) inhibición de la movilización directa o indirecta del aminoácido, o 3a) fallo en un mecanismo de regulación de su síntesis.

Para el planteamiento de un modelo bioquímico específico tuvo especial importancia el descubrimiento del efecto del α -cetoglutarato sobre los resultados del análisis colonial (GUINEA, 1966). Cuando una parte de la glucosa es sustituida por α -cetoglutarato desaparece la heterogeneidad, acumulándose glutamato alrededor de todas las colonias

con una gran uniformidad. Este hecho fue interpretado como una fenocopia, según la cual el genotipo sg^- presentaría un fenotipo idéntico al sg^+ . 3.1

El efecto del α -cetoglutarato elimina la segunda alternativa de las antes señaladas como posibles causas del acúmulo de glutamato en el "pool" celular. En exceso de α -cetoglutarato se forma glutamato en cantidad suficiente para ser excretado al medio tanto en los elementos sg^- como en los sg^+ .

Lo señalado en los párrafos anteriores constituye la base de la formulación de un modelo de regulación de la síntesis del glutamato en C. intermedium C 3 de acuerdo con el de represión enzimática de JACOB y MONOD, (1961)



En este caso, una sustancia aporrepresora, AR , formada por un gene regulador, r , daría lugar al represor activo con el glutamato como correpresor. Este represor debería inhibir la síntesis de alguno de los enzimas $e_2, e_3, e_4 \dots$, comprendidos en un operón definido delimitado por el operador o . Este último excluiría el gene a correspondiente al

Los elementos sg^+ tendrían inutilizado este mecanismo regulador, como consecuencia de la presencia del factor episómico S, posiblemente en estado integrado (Vid. 4.6 y 6).

El referido modelo podía dar razón tanto de la segregación de glutamato como fenómeno de desregulación metabólica, como de la heterogeneidad de comportamiento a este respecto de los individuos de la población. También es completamente compatible con el equilibrio entre los mismos, de acuerdo a cómo se ha establecido hasta ahora (HERNANDEZ, 1968; HERNANDEZ y PARES, 1969). Sin embargo, su verificación requiere, por una parte, comprobar las diferencias de actividad enzimática existentes entre los individuos sg^+ y sg^- , y por otra, demostrar que la utilización de la glucosa u otro sustrato exterior no se ve específicamente incrementada por un mecanismo independiente del que afecta a la síntesis de glutamato.

El primer aspecto ha sido extensamente abordado por URGELL (URGELL y PARES, 1969; URGELL, 1970). El segundo tiene su punto de partida en los trabajos de GUINEA (1966) y HERNANDEZ (1968) y, además, es el objeto de los experimentos que se refieren en el presente capítulo.

3.2 FENOCOPIA PRODUCIDA POR EL X-CETOGLUTARATO

3.2.1 Primeras observaciones sobre el efecto del α -cetogluturato.

Las primeras experiencias destinadas a estudiar el efecto del α -cetogluturato sobre la segregación de glutamato fueron llevadas a cabo por GUINEA (1966), quien sustituía un 25% en peso de la glucosa del medio M 1 por α -cetogluturato sódico. Una suspensión celular de la cepa C 3 se extendía sobre placas de M 1 y se incubaba a 30^o hasta que las colonias resultasen visibles (18-20 h.) Entonces, estas colonias se trasladaban al medio con α -cetogluturato con un tampón de terciopelo, de acuerdo con la técnica de los calcos ("replica plating") utilizada primeramente por LEDERBERG para la demostración de la mutación bacteriana (LEDERBERG, 1952). Las placas de M 1 y sus copias en M 1'- α -cetogluturato se incuban a 30^o C por otras 18-24 h, después de las cuales se revela como de ordinario con la cepa P 60 de L. mesentericoides.

La lectura del análisis colonial puso de manifiesto el hecho de que en M 1'- α cetogluturato todas las colonias resultaban del tipo A, aun aquellas que sobre M1 eran de los tipos C y B. Además, los halos eran muy semejantes y ligeramente mayores que los de las colonias A correspondientes en M 1 (GUINEA, 1966).

3.2.2 Confirmación de la homogeneidad colonial en medios con α -cetoglutarato.

Posteriormente, HERNANDEZ (1968) estudió la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 con respecto a la segregación de alanina, utilizando un método de revelado análogo con la cepa auxotrófica ATCC 8081 alanina dependiente de Pediococcus cerevisiae. Sus resultados permiten establecer una identidad entre la segregación de glutamato y la de alanina.

HERNANDEZ utilizó también para un experimento similar el medio M 1 en el que 1/4 de la glucosa se había sustituido por su equivalente molar de α -cetoglutarato. En este medio no se presentaba heterogeneidad colonial después del revelado con Pediococcus cerevisiae. Por otra parte, las colonias C trasladadas por el método de los calcos se convertían en colonias que no podían distinguirse de las correspondientes al traslado de colonias A después del referido revelado.

Como complemento de estas experiencias, HERNANDEZ (1968) hizo finalmente revelados en los que la glucosa se sustituía en parte por α -cetoglutarato. Las colonias se revelaban simultáneamente en éstos y en medios con citrato, isocitrato, o glioxilato, encontrándose un resultado superponible al señalado por GUINEA en el revelado paralelo en M 1 y M 1' α cetoglutarato.

3.2.3 Sustitución total de la glucosa por α -cetoglutarato.

En los trabajos anteriormente referidos no se había ensayado el efecto de la sustitución total de la glucosa por su equivalente molar de α -cetoglutarato. El medio con dicho sustrato como única fuente de carbono, tiene 5,407 g/l. de ácido α -cetoglutárico, el cual se neutraliza con NaOH 0,1 N en el medio, antes de añadir el agar, en una fracción del agua total.

Las condiciones de crecimiento en el medio M 1 α -cetoglutarato se estudian sembrando en placa suspensiones diluidas en Ringer 1/4 del crecimiento de 24 h en tubos de agar-M 1 inclinado. Por incubación a 30^o C las colonias no alcanzan un diámetro de alrededor de 0,8 mm hasta después de 51 h. Aunque este diámetro es ligeramente inferior al establecido por las condiciones de revelado sobre M 1, fue el que se utilizó en los revelados en el medio de α -cetoglutarato para aumentar la resolución del método. En estas condiciones, normalmente, se encontraría un número mayor de colonias C. El diámetro final puede llegar a ser superior al milímetro.

Después de 24 h de revelado con la cepa P-60 de L. mesenteroides a 37^o C todas las colonias estaban provistas de halos uniformes y densos del tipo del de las colonias A, en un total de 149 colonias estudiadas, distribuidas en 4 placas.

El retraso en el desarrollo de las colonias so-

bre M 1 \rightarrow cetoglutarato tiene lugar también cuando se lleva a cabo un calco por el método de los tampones, a partir de M 1. La recuperación en este último tiene lugar en 4-8 h a 30°C, en tanto que se requieren 26 h para poder revelar en M 1 \rightarrow cetoglutarato. En todo caso, se ha comprobado que todas las colonias que se desarrollan sobre M 1 pueden crecer en el referido medio.

3.2.2

3.3 UTILIZACION DEL CITRATO COMO UNICA FUENTE DE CARBONO.

La heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 creciendo en medios con citrato ya había sido estudiada por GUINEA (1966) -quien sustituía parte de la glucosa del M 1 por citrato- y por HERNANDEZ (1968) -quien la sustituía totalmente por su equivalente molar.

Por el método de los calcos, se observaba una concordancia entre los tipos coloniales de los dos medios tan grande como la que se encontraba entre los calcos sobre el mismo medio. Por otra parte, la misma suspensión bacteriana sometida a análisis coloniales sobre M 1 y M 1-citrato dio porcentajes de A estadísticamente iguales. Ambos resultados constituían una confirmación importante del modelo bioquímico propuesto para explicar la heterogeneidad colonial (Vid. 3.1) y

(HERNANDEZ, 1968).

Independientemente y por el mismo tiempo, 3.3
fueron realizadas experiencias semejantes con un resulta-
do totalmente concordante (Cuadro 3.3). Se llevó a ca-
bo el análisis colonial del crecimiento de 24 h a 30°C -
en tubos de agar-M 1 inclinado, simultáneamente sobre -
placas de agar-M 1 y de agar M 1-citrato. Los resul-
tados obtenidos sobre un total de 88 y 86 colonias, res-
pectivamente, dan unos valores promedio del porcentaje de
colonias A que no difieren significativamente, de acuerdo -
con el correspondiente valor de la t de Student (SCHWARTZ
1963).

3.4 DISOCIACION COLONIAL INDUCIDA POR EL CITRATO

3.4.1 Tipos coloniales de *C. intermedium* C 3

La colonia normal de *C. intermedium* C 3 sobre
placas de agar-M 1 es una colonia opaca circular, de uno a
dos milímetros de diámetro máximo, brillante, de consistencia
cremosa y no pigmentada. Ocasionalmente pueden aparecer
unas colonias diminutas, y, más raramente, otras que conti-
núan creciendo hasta alcanzar un diámetro de 3 ó 4 mm con
borde ondulado. Estas últimas sólo se encuentran en placas

CUADRO 3.3

ANALISIS COLONIAL DE LA MISMA POBLACION DE
C. INTERMEDIUM C 3 EN M1 y M 1-CITRATO

Placa	Total colonias	B+C	P(%B+C)	M-P	(M-P) ²
M 1 (glucosa)					
1	27	11	40,8	-5,6	31,2
2	16	5	31,3	3,9	15,2
3	14	5	35,7	-0,5	0,25
4	<u>31</u>	<u>10</u>	32,4	3,2	10,2
	88	31			(64% A)
M 1-citrato					
1	15	5	33,3	6,3	39,6
2	10	4	40,0	-0,4	0,16
3	33	14	42,4	-2,8	7,8
4	<u>28</u>	<u>11</u>	39,3	0,3	0,09
	86	34			(60% A)

M = 35,2 $\sum (M-P)^2 = 56,85$
M' = 39,6 $\sum (M'-P')^2 = 47,65$
g. d. 1. = 6 t = 1,4 NO SIGNIFICATIVO

viejas y pueden presentar una ligera pigmentación violeta; 3.4 recuerdan el crecimiento en tubos de agar inclinado después de varias semanas. Estos dos tipos distintos de crecimiento no se han tenido en cuenta con relación al análisis de la segregación de glutamato, si bien han sido observados por todos aquellos que han trabajado durante algún tiempo en el problema. La disociación colonial es un fenómeno relativamente normal en algunas cepas bacterianas y constituye una problemática completamente diferente de la aquí estudiada.

HERNANDEZ (1968) encontró otro tipo de desarrollo en C. intermedium C 3 al utilizar medios en los que la glucosa había sido sustituida por el citrato. Se trataba de unas colonias diminutas, de centro opaco y periferia transparente, con borde ondulado. Este fenómeno es completamente distinto, puesto que corresponde a un desarrollo vegetativo diferente, parecido al desarrollo L de algunas Eubacteriales. Igual tipo de desarrollo plasmático ha sido también encontrado por otras personas en el mismo laboratorio (VALLOIX, 1969 b); puede mantenerse en M I, pero revierte con facilidad al desarrollo normal y hasta el momento no ha sido tomado como objeto particular de estudio.

El sustrato que puede considerarse como inductor del referido tipo de desarrollo de C. intermedium C 3 da lugar también a un nuevo tipo de disociación colonial. Este consiste en la presencia de colonias que sólo difieren de las normales en su mayor diámetro, pero constituidas en apariencia por un desarrollo vegetativo idéntico. Su diámetro -

alcanza fácilmente 2-3 mm en placas con un número muy elevado de colonias, cuyo diámetro normal queda detenido por debajo de medio milímetro. Como en otras cepas bacterianas, el diámetro de las colonias normales de C. intermedium C 3 disminuye con la densidad colonial, cuando ésta es suficientemente grande (BRAUN, 1965; CLOTET, 1967). Las referidas colonias gigantes parecen sustraerse a este efecto ya que al principio no pueden distinguirse de las normales, pero luego siguen creciendo, en tanto que el desarrollo de aquéllas se detiene.

En el presente apartado se refieren una serie de experimentos llevados a cabo con intención de dilucidar una posible conexión entre este tipo colonial y el dualismo sg^+ , sg^- .

3.4.2 Frecuencia de colonias gigantes en la población de una colonia C y su variación a lo largo del cultivo.

De acuerdo con los resultados del experimento consignado en el Cuadro 3.4.2 a el porcentaje de colonias gigantes que pueden desarrollarse sobre M 1-citrato a partir de una colonia C es nulo o muy pequeño. En cambio, aumenta significativamente a las 3 h de incubación en M 1, para luego volver a disminuir hasta valores del orden del 2 % a las 24 h. Esto indujo a pensar que algunos de -

CUADRO 3.4.2a

DISOCIACION COLONIAL INDUCIDA POR EL CITRATO.

EXPERIMENTO PRELIMINAR

Tiempo incub. en M 1 líquido	Tiempo incub. en M 1-cit. en placa	Nº total de col.	Nº col/pl	Nº col grandes tajos.	Porcen tajos.
0 h	24 h.	214	21,4	0	0,
3 h	24 h	272	18,1	38 total	14
12 h	7 días	10 x 400	400 aprox.	20-25/pl	5,1
24 h	7 días	3 x 4000	4000 aprox.	80-100/pl	2,5

los cambios que ocurrían en la población de la colonia C 3.4 durante su desarrollo en M 1 eran concomitantes con definidas variaciones en este tipo de disociación colonial.

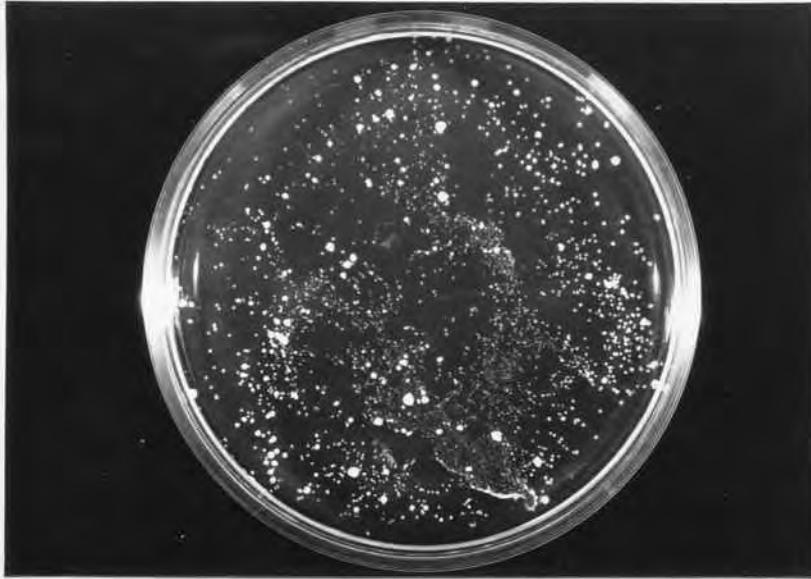
Seguindo las observaciones de HERNANDEZ, (1968), durante las primeras horas de incubación en M 1 de una colonia C tiene lugar un cambio preponderantemente en el sentido $sg^- \rightarrow sg^+$, que se estabiliza por la variación retrógrada correspondiente hacia las 12 h. Estas formas sg^+ originadas de nuevo durante esa fase de crecimiento dependen en alto grado de la posibilidad de una transferencia de material genético célula a célula. En cambio, no existe una evidencia experimental definida en relación al valor de la infección episémica en el equilibrio $sg^+ \rightleftharpoons sg^-$ que se establece últimamente en la población. Por esto, la disociación colonia normal \rightarrow colonia gigante se estudió como un proceso paralelo a la formación de sg^+ a partir de una colonia C.

En las Fotografías 3, 4a, b y c, puede observarse el aspecto de la disociación colonial en placas correspondientes al cultivo de 12 (3.4a) y 24 h (3.4b y c).

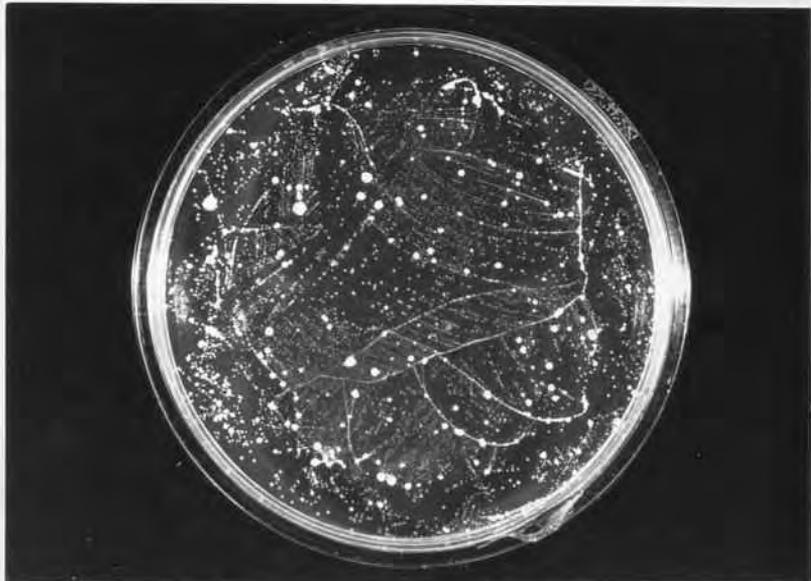
En el Cuadro 3.4.2b se consignan los resultados de la enumeración viable de una colonia C en M 1 y M 1-citrato. Dicha colonia se había desarrollado 30 h sobre M 1 a $30^\circ C$, y 24 h a $37^\circ C$ bajo el medio de revelado. Los dos valores obtenidos no son significativamente distintos, y en ambos casos corresponden a un número viable inferior al de la colonia de 30 h, antes del revelado



12 horas



24 horas



24 horas

FOTOGRAFÍAS 3.4a, b y c Disociación colonial de C. intermedium C 3 en agar-M 1 citrato después de 12 y 24 h de incubación en M 1.

(vid.2.1.3.1). Este resultado sugiere que la viabilidad es la misma en ambos medios. 3.4

En el Cuadro 3.4.2c se refieren las enumeraciones viables necesarias para calcular las diluciones adecuadas a la enumeración en el experimento del Cuadro 3.4.2a. Otra determinación análoga se ha llevado a cabo en relación al experimento descrito en el Cuadro 3.4.2d, en donde la colonia C utilizada dio una enumeración viable de $5,5 \times 10^6$ células.

El experimento registrado en los Cuadros 3.4.2d y d' es análogo al del 3.4.2a. Un número mayor de colonias permite poner de manifiesto que en la colonia C también se encuentran células capaces de dar una colonia gigante sobre el medio M 1-citrato. En este experimento, la frecuencia inicial de colonias gigantes no es sustancialmente distinta a la de la población incubada 3 h en M 1. Como una frecuencia de este orden hubiese sido detectada en la experiencia anterior, se destaca que la frecuencia de colonias gigantes es posiblemente distinta según sea la colonia utilizada; resultado que se confirma en el experimento descrito en los Cuadros 3.4.3a y b.

Independientemente, puede observarse que la aparición de colonias gigantes está ligada al desarrollo en M 1-citrato (Cuadro 3.4.2d, series 1 y 2). Como en el caso anterior, la frecuencia de las mismas va disminuyendo con el tiempo de incubación.

CUADRO 3.4. 2b

ENUMERACION VIABLE DE UNA COLONIA C EN M 1
Y M 1-CITRATO

Medio	Dilución	Células/placa	Estima células/colona C
M 1	$2,5 \times 10^{-2}$	91	$3,640 \times 10^6$
M 1-citrato	5×10^{-1}	214	$4,280 \times 10^6$

CUADRO 3.4.2c

DETERMINACION DEL NUMERO DE GENERACIONES DES-
PUES DISTINTOS TIEMPOS DE CULTIVO EN M 1

Tiempo incub. en tubo	Estima del nº inicial N_0	Nº final en tubo N	N/N_0	Nº de gener. n	Veloc.de crec. $n/hora$
3 h	396	1813	4,57	2,2	0,73
12 h	39,6	4×10^4	10^3	9,9	0,82
24 h	3,96	8×10^5	2×10^5	16,6	0,69

CUADRO 3.4.2d

DISOCIACION COLONIAL EN M 1-CITRATO UTILIZANDO GRAN
DES NUMEROS DE COLONIAS POR PLACA

Serie	Medio	Tiempo incubac. en tubo	Media nº col/placa	Nº col. grandes en cada placa							Total col. grandes
				1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	
1	M 1	0 h	550	0	0	0	0	0	0	0	0
2	M 1-cit.	0 h	5500	39	37	44	44	36	45	-	245
3	M 1-cit.	3 h	5000	58	39	46	59	52	-	-	253
3'	M 1-cit.	3 h	10000	110	122	112	106	84	-	-	534
4	M 1-cit.	13 h	5600	12	18	9	14	0	-	-	53
4'	M 1-cit.	13 h	11300	26	21	19	35	27	-	-	128
5	M 1-cit.	24 h	10500	0	13	0	10	0	-	-	23
5'	M 1-cit.	24 h	22600	23	22	18	15	0	-	-	78

CUADRO 3.4.2d'

FRECUENCIA DE COLONIAS GRANDES EN M 1-CITRATO
 UTILIZANDO GRANDES NUMEROS DE COLONIAS POR
 PLACA

Serie	Medio	Tiempo incubac. en tubo	Tiempo incubac. en placa	Nº placas	Nº col/pl	Nº col. grandes	Media frec. placa
1	M 1	0 h	96 h	7	550	0	0
2	M 1-cit.	0 h	96 h	6	5500	245	40,8
3	M 1-cit.	3 h	93 h	5	5000	253	50,6
3'	M 1-cit.	3 h	93 h	5	10000	534	106,8
4	M 1-cit.	13 h	83 h	5	5600	53	10,6
4'	M 1-cit.	13 h	83 h	5	11300	128	25,6
5	M 1-cit.	24 h	72 h	5	10500	23	4,6
5'	M 1-cit.	24 h	72 h	5	22600	78	15,6

3.4.3 Influencia del tipo de población sobre la frecuencia de colonias gigantes.

Los resultados relatados sugirieron llevar a cabo unos nuevos experimentos, en los que la frecuencia de colonias gigantes fuera simultáneamente examinada partiendo de colonias A y C. Los datos correspondientes se indican en los Cuadros 3.4.3a y b. En ellos hay que tener en cuenta que los cultivos de 14 y 24 h proceden de un inóculo 100 veces menor que los restantes, lo cual, inicialmente, se hizo con el fin de facilitar la enumeración e identificación en placa. Sin embargo, sirvió para poner de manifiesto que el tamaño del inóculo es un factor importante en la frecuencia absoluta de colonias gigantes. Cuando se inicia el cultivo con muy pocas células el máximo de colonias gigantes se alcanza mucho más tarde. En las diferencias encontradas entre los distintos experimentos referidos, este factor se superpone al efecto de las diferencias existentes entre colonias, las cuales son aparentes al comparar una colonia A con otra C (Cuadro 3.4.3a y 3.4.3b, respectivamente). Al parecer, la disociación gigante sería consecuencia de un factor soluble producido durante el crecimiento, el cual se da exclusivamente o con mayor intensidad en la fracción de la población más abundante en las colonias A con respecto a las C.

La referida interpretación, si bien tiene carácter de simple modelo para proseguir el análisis del fenómeno, cobra especial interés al considerar que la diferencia es

CUADRO 3.4.3a

DISOCIACION COLONIAL EN M 1-CITRATO EN DISTINTOS
TIEMPOS DE INCUBACION, INOCULO: COLONIA A

Tiempo de incubación	Nº placas	Nº col/pl N	Nº de col grandes	Media col gr/pl M	Frecuencia M/N
0 h	3	1666	253	84,3	$50,6 \cdot 10^{-3}$
1,30 h	3	4300	492	164	$38,1 \cdot 10^{-3}$
3,30 h	3	8000	372	124	$15,5 \cdot 10^{-3}$
5 h	3	20000	392	130,6	$6,53 \cdot 10^{-3}$

14 h	3	1500	197	66,3	$44,2 \cdot 10^{-3}$
24 h	3	374	10	3,3	$8,9 \cdot 10^{-3}$

CUADRO 3.4.3b

DISOCIACION COLONIAL EN M 1-CITRATO EN DISTINTOS
TIEMPOS DE INCUBACION, INOCULO: COLONIA C

Tiempo de incubación	Nº placas	Nº de col/pl N	Nº de col grandes	Media col gr/pl M	Frecuencia M/N
0 h	3	2500	223	74,3	$29,7 \cdot 10^{-3}$
1,30 h	3	4600	555	185	$40,2 \cdot 10^{-3}$
3,30 h	3	8000	444	148	$18,5 \cdot 10^{-3}$
5 h	3	20000	591	197	$9,85 \cdot 10^{-3}$

14 h	3	2000	344	114,6	$57,3 \cdot 10^{-3}$
24 h	3	402	37	12,3	$30,6 \cdot 10^{-3}$

precisamente la frecuencia de elementos sg+. Por otra parte, el análisis colonial de colonias gigantes y pequeñas que se señala en el Cuadro 3.4.3c pone de manifiesto - que las colonias grandes tienen un porcentaje muy elevado de células sg+. Son un tipo de colonia que podría ser denominado super A, por cuanto daría un revelado necesariamente de colonia A por el tamaño, además de darlo - por la frecuencia de elementos sg+; también cabría denominarlo colonia A gigante. Es evidente que dentro de las colonias pequeñas habrá colonias A, B y C; por lo tanto, las frecuencias de colonias A señaladas en el cuadro son perfectamente coherentes, aun prescindiendo de las inevitables fluctuaciones del análisis colonial. 3.4

En la Figura 3.4.3 se expresan gráficamente los resultados del efecto del tamaño y proporción células sg+ del inóculo en la frecuencia de colonias gigantes a lo largo del tiempo de incubación, según los datos de los Cuadros 3.4.3 a y b.

En las Fotografías 3.4.1 a 3.4.6 se representa el aspecto de algunas placas del experimento anterior, correspondiendo la 1, 3 y 5 a la colonia A y las otras a la C, para los tiempos de incubación en M 1 de 0, 1, 30 y 3 h correlativamente.

Finalmente, debe señalarse que los hechos indicados no pueden tomarse más que como punto de partida del análisis colonial de una característica fenotípica de C. intermedium C 3, relacionada con la dinámica del material epi-

CUADRO 3.4.3c

ANALISIS COLONIAL DE LAS POBLACIONES PROCEDENTES DE COLONIAS CRECIDAS EN M 1-CITRATO

Población original	Población en M 1-cit.	Placa nº	Total	Análisis colonial			% A
				A	B	C	
Colonia A							
	Colonia pequeña	1	20	9	11	0	
		2	26	17	9	0	
		3	11	4	7	0	
		4	27	21	6	0	
							60,7
	Colonia grande	1	41	34	7	0	
		2	63	61	2	0	
		3	38	36	2	0	
		4	75	69	6	0	
		5	44	40	4	0	
							91,9
Colonia C							
	Colonia pequeña	1	66	54	12	0	
		2	25	21	4	0	
		3	32	23	9	0	
							79,6
	Colonia grande	1	26	26	0	0	
		2	54	52	2	0	
		3	28	21	7	0	
		4	31	26	5	0	
							89,9

sómico que condiciona la segregación de glutamato. Es 3.4
particularmente verosímil que la formación de colonias gi-
gantes coincida con estados inestables de la población, -
fuera del equilibrio $sg^+ \rightleftharpoons sg^-$ que se alcanza en el
cultivo ordinario de dicha cepa bacteriana en M 1.

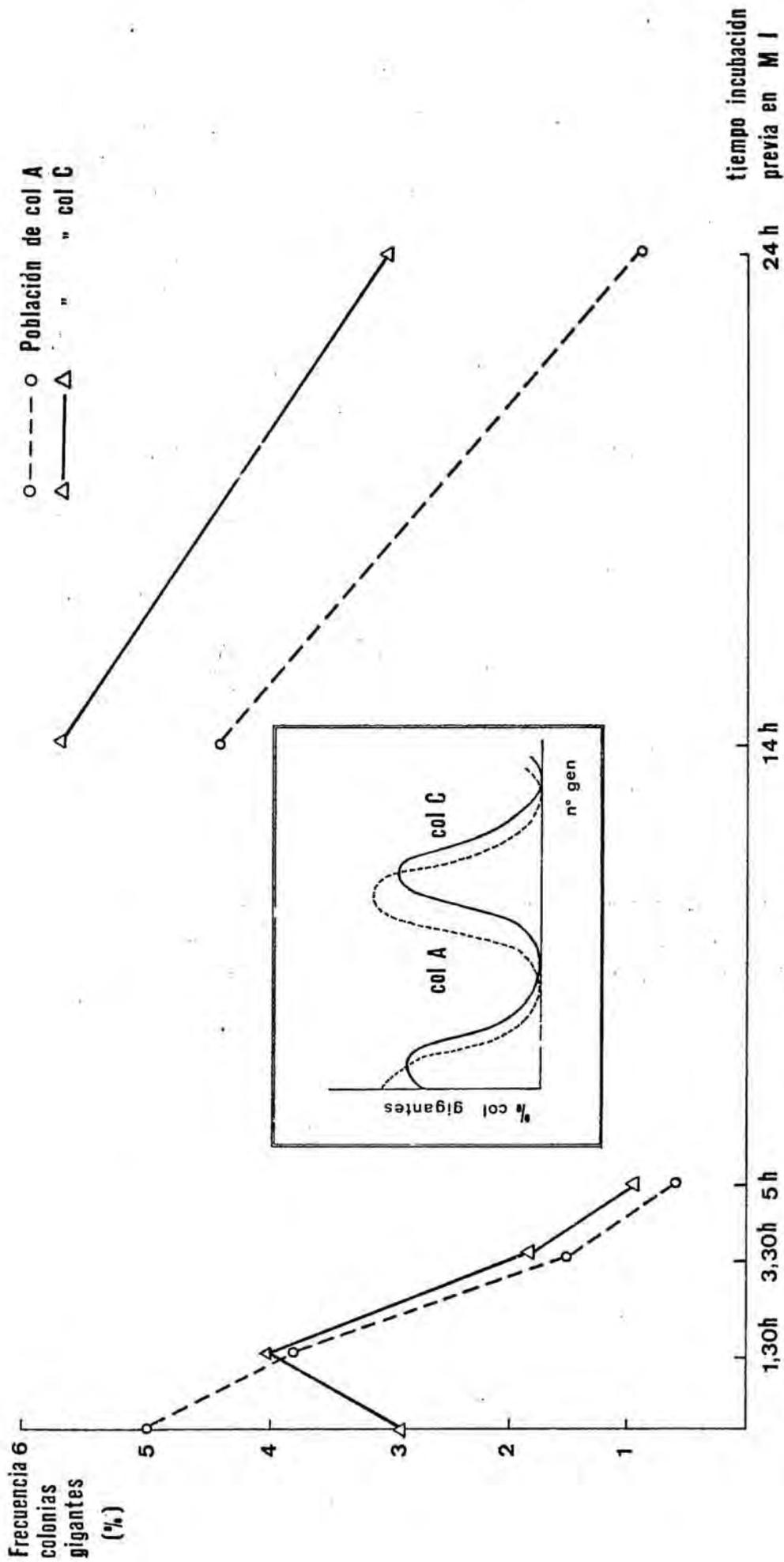


FIGURA 3.4.3 Variación del número de colonias gigantes de C. intermedium C 3 en agar-M 1 cítrato después de diversos periodos de incubación en M 1.

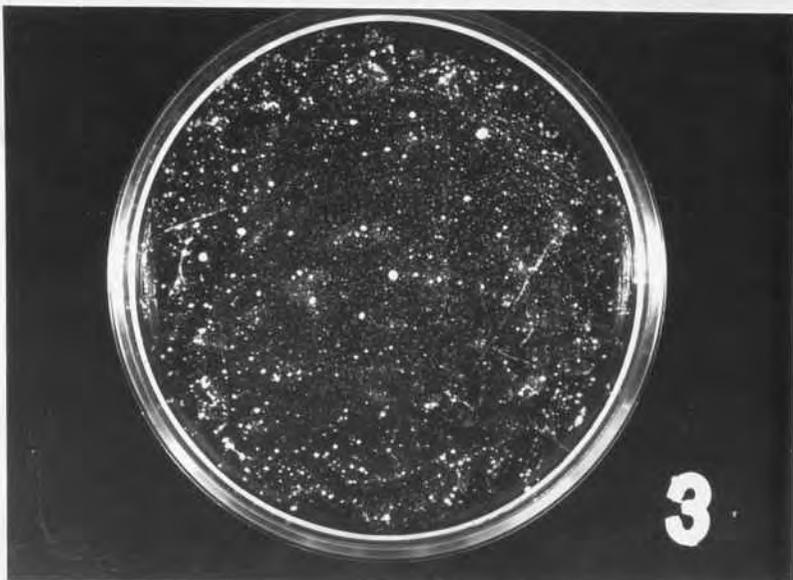


Población
de colonia A

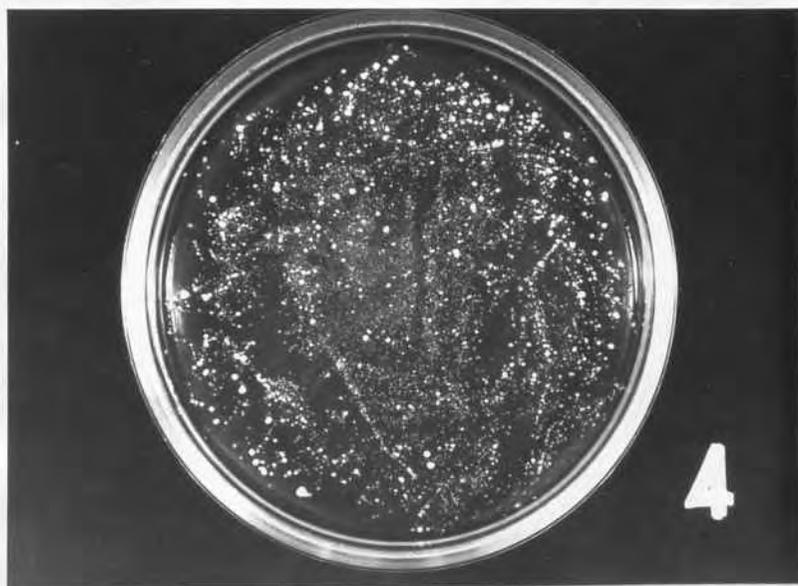


Población
de colonia C

FOTOGRAFÍAS 3.4.1 y 3.4.2 Disociación colonial inicial de C. intermedium C 3 en agar-M 1 citrato. Poblaciones procedentes de colonias A y C.



Población
de colonia A

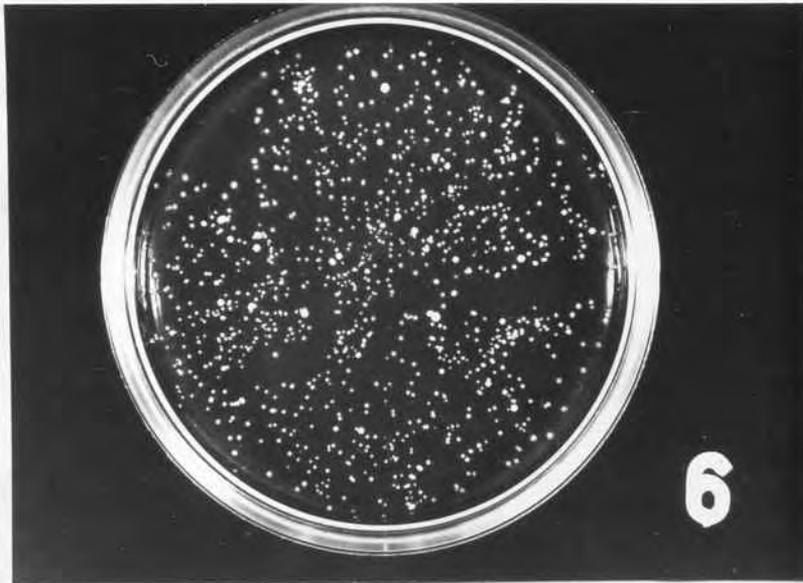


Población
de colonia C

FOTOGRAFÍAS 3.4.3 y 3.4.4 Disociación colonial de C. inter-
medium C 3 en agar-M 1 citrato después de 1,30 h de incuba-
ción en M 1. Poblaciones procedentes de colonias A y C.



Población
de colonia A



Población
de colonia C

FOTOGRAFIAS 3.4.5 y 3.4.6 Disociación colonial de C. intermedium C 3 en agar-M 1 citrato después de 3,30 h de incubación en M 1. Poblaciones procedentes de colonias A y C.

3.5 SUSTITUCION DE LA GLUCOSA POR OTROS INTERMEDIARIOS DEL CICLO DEL ACIDO CITRICO.

Los efectos del citrato y del α -cetoglutarato sobre la frecuencia de colonias A permiten atribuir la segregación de glutamato por C. intermedium C 3 a un fallo en el mecanismo de regulación de la síntesis de este aminoácido. Si la síntesis de isocitrato deshidrogenasa está regulada por una represión "feedback" con glutamato, inexistente en los elementos sg+, la utilización de citrato llevará como consecuencia la acumulación de glutamato en dichos elementos, y la no segregación del aminoácido en los sg-, igual que cuando el sustrato es la glucosa. En cambio, el α -cetoglutarato desencadena la segregación de glutamato en ambos tipos celulares.

Los resultados de los experimentos mostrados en los apartados anteriores están de acuerdo con el modelo previsto. Sin embargo, era sugestivo ensayar el efecto de otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico que pueden ser utilizados por C. intermedium C 3 como única fuente de carbono. En cierto modo, ello permitiría controlar el supuesto sistema de regulación de la síntesis de glutamato con un re

llenado del ciclo distinto del que se lleva a cabo cuando se parte de alguno de los intermediarios comprendidos en la vía metabólica que se inicia en la glucosa.

3.5.1 Succinato

En unos primeros experimentos se utiliza como medio de cultivo el M 1 en el que la glucosa ha sido sustituida totalmente por 13,111 g/l de ácido succínico, neutralizado con NaOH.

C. intermedium C 3 crece muy lentamente a 30° C en placas con este medio. Las colonias sólo se hacen visibles después de 4 a 5 días, y siguen creciendo muy despacio, por lo que el tamaño del revelado no se alcanza hasta los 8-10 días. Esto sugiere una lenta utilización del succinato, más que una fase de retraso debida a adaptación, en cuyo caso las colonias crecerían más rápidamente después de hacerse visibles.

Se han llevado a cabo revelados de colonias de C. intermedium C 3 desarrollada sobre el referido medio de succinato, apareciendo exclusivamente colonias A y B. La heterogeneidad colonial es manifiesta a pesar de la ausencia de colonias C, lo cual parece excluir la posibilidad de que el succinato sólo permita el crecimiento de uno de los dos tipos celulares.

En una segunda serie de experimentos se utilizó un medio igual al M 1 en el que la glucosa había sido sustituida por 4,370 g/l de ácido succínico, neutralizado con NaOH; este medio es isosmótico con el M 1. C. intermedium C 3 crece en el mismo a 30°C más rápidamente que en el anterior, aunque se requieren 3-4 días para que las colonias alcancen el tamaño adecuado para el revelado. Este último medio da análogos resultados al anterior, si bien la heterogeneidad colonial es más manifiesta. 3.5.1

Se resembró cinco veces consecutivas por estría sobre el medio de succinato en tubos con agar inclinado, con el fin de ensayar una adaptación de la cepa. Después de la quinta resiembra las colonias alcanzan un tamaño óptimo de revelado, 1,1 mm de diámetro, en unas 36-40 h. Ensayos de crecimiento paralelos a los anteriores permitieron mostrar que cuando se sustituía la glucosa sólo parcialmente por succinato el crecimiento era normal, aun sin adaptación previa.

Ai parecer, el succinato es utilizado lentamente por la población de partida, la cual puede adaptarse después de una serie de generaciones en las que dicho intermediario se ha empleado como única fuente de carbono.

Con la población adaptada se lleva a cabo una serie de experimentos de crecimiento de la misma colonia en M 1 succinato, por calco mediante tampones, en uno y otro sentido. Todas las colonias crecidas en M 1 se mostraron capaces de desarrollarse en M 1-succinato y

viceversa. El revelado correspondiente mostró que las co- 3.5.1
lonias C en M 1 se correspondían con colonias B en M 1-
succinato. La diferencia entre los halos de las colonias A
y B en M 1 coincide aproximadamente con las diferencias
de desarrollo de L. mesenteroides en las placas de succi-
nato.

En el Cuadro 3.5.1 se muestran los resultados
obtenidos en diversas experiencias consistentes en el creci-
miento de una misma población en M 1 y M 1-succinato con
ulterior revelado, en ambos casos con la cepa adaptada al
succinato. Una comparación estricta de las frecuencias de
colonias A es discutible, porque el revelado se lleva a cabo
con los tiempos de incubación necesarios en cada ocasión -
para dar aproximadamente el mismo diámetro de colonia, los
cuales son bastantes diferentes. Es posible que la frecuen-
cia de colonias A sea ligeramente superior en el medio de -
succinato y que la escasez de colonias C en M 1 carezca -
de significación. Esta cepa adaptada al succinato crece al-
go más rápidamente en M 1 en las condiciones normales,
y también crece a 37°C, como se comprueba por el agran-
damiento de las colonias durante el tiempo de revelado.

Es probable que el succinato aumente la segre-
gación específica de glutamato por los elementos sg⁺. La -
concentración crítica de estos últimos para dar una colonia -
C bajo las condiciones normales del revelado sería muy infe-
rior al promedio presente en dicho tipo de colonia sobre -
M 1.

CUADRO 3.5.1

RESULTADOS DEL REVELADO DE UNA CEPA DE C. INTERMEDIUM C 3 ADAPTADA AL SUCCINATO CRECIDA SOBRE M 1 Y M 1-SUCCINATO

Medio	Placa	Tiempo de incubación a 30° C	Tamaño medio de colonia	Nº total colonias	Análisis colonial		
					A	B	C
M 1-succinato							
	1	72 h	0,8-1,0 mm	55	49	6	0
	2	id	id	52	44	8	0
	3	52 h	0,7 mm	35	23	12	0
	4	id	id	21	16	5	0
	5	id	id	24	20	4	0
	6	id	id	19	16	3	0
	7	63 h	1,1 mm	33	26	7	0
	8	id	id	19	14	5	0
	9	id	id	29	25	4	0
	10	id	id	14	12	2	0
				301	245	56	0
M 1							
	1	27 h	1,3 mm	37	24	13	0
	2	id	id	39	29	10	0
	3	id	1,2 mm	45	30	15	0
	4	id	id	40	19	16	5
	5	28 h	1,2 mm	19	5	14	0
	6	id	id	17	8	9	0
	7	id	id	15	4	11	0
	8	26 h	1,1 mm	52	20	31	1
	9	id	id	35	15	20	0
	10	id	id	36	17	19	0
				335	171	158	6

FRECUENCIA DE COLONIAS A: en M 1-succinato, 81%; en M 1, 51 %

3.5.2 Malato

El medio empleado era el M 1 en el que la glucosa había sido sustituida totalmente por 14,888 g/l de ácido málico, neutralizado con NaOH y esterilizado por filtración antes de añadir al medio. A partir de los primeros experimentos se utilizó una concentración isosmótica con la glucosa del M 1, es decir, 4,962 g/l de ácido málico.

En las condiciones standard del revelado se observó desde el principio que todas las colonias de C. intermedium C 3 crecidas en M 1-malato en placa a 30° C, presentaban un potente halo de crecimiento de L. mesenteroides y por tanto debían ser clasificadas como colonias A. Se analizaron 327 colonias, correspondientes a 18 placas, manifestando todas un halo visible, que en muchos casos era mayor (4 mm de diámetro, incluyendo la colonia) y denso que lo normal.

3.5.2.1 Revelado a tiempos variables de incubación a 30° C.

A la vista de los resultados expuestos, se pensó en variar las condiciones del revelado para conseguir apreciar cualquier variación en las diferentes colonias en lo que respecta a la segregación de glutamato.

Con un diámetro de colonia de 1,0 a 1,2 mm. 3.5.2 alcanzado a las 30-32 h, todas las colonias resultaban ser A. Pero era seguro que podía encontrarse un tamaño suficientemente pequeño de colonia que no soportase ningún crecimiento de L. mesenteroides. Además, podía estudiarse la diferencia progresiva de las colonias, a lo largo de tiempos cada vez más cortos de incubación a 30°C.

Se hicieron varios experimentos en los que se acortó el tiempo de incubación de C. intermedium C 3 progresivamente desde las 30-32 h habituales, pasando por 29, 28, ..., 24, con un total de 12 placas con 127 colonias, que resultaron todas A, aunque con halos menos densos. Finalmente, se hicieron revelados sucesivos sobre placas con colonias desde tamaños de 0,6 hasta 1,0 mm de diámetro. Los resultados indicados en el Cuadro 3.5.2.1 manifiestan el cambio paulatino de las colonias, con la aparición de halos en algunas de ellas en el mismo tiempo en que otras carecían de éstos.

3.5.2.2 Heterogeneidad colonial en M 1 y M 1-malato.

Los resultados descritos en el Cuadro 3.5.2.1 ponen de manifiesto la existencia de heterogeneidad colonial en cuanto a la segregación de glutamato en M 1-malato por C. intermedium C 3. Esto llevó a comprobar los resultados del análisis colonial sobre M 1 y M 1-malato. Se efectuaron a partir de colonias C y con tiempos reducidos de -

CUADRO .3.5.2.1

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3
EN M 1-MALATO A DISTINTOS TIEMPOS DE INCUBACION A

30° C

Placa	Tiempo de incubación a 30° C	Tamaño medio de colonia	Total	ANALISIS COLONIAL		
				A	B	C
1	18 h	0,6 mm	27	0	0	27
2	20 h	0,7 mm	18	0	5	13
3	22,30 h	0,8 mm	20	1	10	9
4	23 h	0,8 mm	19	3	1	15
5	24 h	0,9 mm	34	15	7	12
6	25,30 h	1,0 mm	16	12	0	4

incubación a 30^o C y de revelado con L. mesenteroides, 3.5.2 iguales los dos en ambos casos. En el Cuadro 3.5.2.2 se consignan los resultados obtenidos en varios experimentos; la mayor frecuencia de colonias A en M 1-malato es manifiesta. Sin embargo, esta frecuencia depende del tiempo de incubación a 30^o C (Vid. Cuadro 3.5.2.1), como ocurre sobre M 1. Por lo tanto, el número mínimo necesario de elementos sg⁺ para producir halo de crecimiento de L. mesenteroides deberá ser menor sobre M 1-malato, o, lo que es lo mismo, la segregación específica de glutamato en este medio por los elementos sg⁺ es mayor que en M 1. Otra alternativa sería la posibilidad de un aumento de la velocidad de multiplicación de sg⁺ en el medio de M 1-malato.

En α -cetoglutarato los elementos sg⁺ y sg⁻ segregan glutamato; pero, además, la cantidad de aminoácidos segregada por célula es mayor que la de sg⁺ en M 1 (LIRGELL, 1970). Por otra parte, más adelante se comprobará experimentalmente que sg⁺ se multiplica más rápidamente que sg⁻ en M 1; por lo tanto, el efecto del malato sobre la heterogeneidad colonial puede ser consecuencia de cualquiera de los mecanismos o incluso de ambos (Vid. 4.5)..

CUADRO 3.5.2.2

HETEROGENEIDAD COLONIAL EN M 1 Y M 1-MALATO DE LA POBLACION DE COLONIAS C DE CITROBACTER INTER-MEDIUM C 3

Experimento	Medio M 1				Medio M 1- malato			
	Total	A	B	C	Total	A	B	C
1	21	0	10	11	18	8	9	1
	10	1	6	3	15	13	2	0
	7	1	2	4	8	3	5	0
	11	0	5	6	10	7	3	0
	49	2	23	24	51	31	19	1
2	16	0	10	6	17	14	3	0
	36	0	13	23	7	5	2	0
	16	0	11	5	16	10	6	0
	25	0	14	11	13	6	7	0
	93	0	48	45	53	35	18	0
3	11	0	7	4	9	4	5	0
	17	2	8	7	10	10	0	0
	28	2	15	11	19	14	5	0

3.5.2.3 Enumeraciones viables en M 1 y M 1-malato.

En las experiencias anteriores se observó que el número de colonias por placa en M 1-malato era sistemáticamente menor que en M 1, partiendo de la misma dilución y tipo de población. En realidad, las diferencias podían ser debidas al azar, por lo que se llevaron a cabo experimentos adicionales de verificación. Los resultados obtenidos se registran en los Cuadros 3.5.2.3 a, b y c, encontrándose números viables significativamente distintos para los tres tipos de población, cepa standard, seleccionada sg+ y seleccionada sg-.

Las poblaciones seleccionadas con respecto a la frecuencia de elementos sg+ y sg- fueron obtenidas con anaranjado de acridina, tal como se consigna en 4.7. La reducción relativa del número viable es un 20% para la cepa standard, 40% para la población seleccionada Ssg+ y 60% para la S sg-. No obstante, estas diferencias no son significativas entre sí, hasta donde alcanzan los resultados obtenidos. Al parecer existe una fracción de la población de C. intermedium C 3 obtenida sobre M 1 que no es viable sobre M 1-malato, la cual debe de ser relativamente importante, ya que puede detectarse por enumeración viable. No existe indicio de que esta población esté directamente relacionada con el carácter sg+ o sg-.

CUADRO 3.5.2.3a

ENUMERACION VIABLE DE LA CEPA STANDARD DE C.
INTERMEDIUM C 3 EN M 1 Y M 1-MALATO

<u>M 1 (Glucosa)</u>				<u>M 1-Malato</u>			
Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²	Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²
1	110	15	225	1	93	9,1	82,8
2	108	13	169	2	87	3,1	9,6
3	108	13	169	3	79	- 4,9	24,0
4	87	- 8	64	4	85	1,1	1,2
5	90	- 5	25	5	79	- 4,9	24,0
6	100	5	25	6	97	13,1	171,6
7	67	-28	784	7	82	- 1,9	3,6
8	102	7	49	8	69	-14,9	222,0
9	83	-12	144	9	81	- 2,9	8,4
10	95	0	0	10	76	- 7,9	62,4
11	96	1	1	11	95	11.1	123,2

M 1 : M = 95,0 $\sum (M-P)^2 = 1655,0$

M 1-Malato : M = 83,9 $\sum (M-P)^2 = 732,9$

Para 20 g d l, t = 2,44; SIGNIFICATIVO

CUADRO 3.5.2.3b

ENUMERACION VIABLE DE LA POBLACION SELECCIONADA
S sg+ DE C. INTERMEDIUM C 3 EN M 1 Y M 1-MALATO

<u>M 1 (Glucosa)</u>				<u>M - Malato</u>			
Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²	Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²
1	54	-16,1	259,2	1	50	8,5	72,2
2	51	-19,1	364,8	2	35	-6,5	42,2
3	60	-10,1	102,0	3	34	-7,5	56,2
4	70	- 0,1	0,0	4	32	-9,5	90,2
5	64	- 6,1	37,2	5	39	-2,5	6,2
6	92	21,9	479,6	6	30	-11,5	132,2
7	94	23,9	571,2	7	29	-12,5	156,2
8	76	5,9	39,8	8	69	17,5	306,2
9	78	7,9	62,4	9	62	20,5	420,2
10	62	- 8,1	65,6	10	35	- 6,5	42,2

M 1 : M = 70,1 $\sum (M-P)^2 = 1981,9$

M 1-malato: M = 41,5 $\sum (M-P)^2 = 1324,5$

Para 18 g d l, t = 4,7; SIGNIFICATIVO

CUADRO 3.5.2.3c

ENUMERACION VIABLE DE LA POBLACION SELECCIONADA
S sg- DE C. INTERMEDIUM C 3 EN M 1 Y M 1-MALATO

<u>M 1 (Glucosa)</u>				<u>M 1-Malato</u>			
Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²	Placa	Nº de colonias	M-P	(M-P) ²
1	171	77,8	6062,1	1	54	26	676
2	141	47,8	2290,6	2	44	16	256
3	182	88,8	7896,1	3	32	4	16
4	96	2,8	8,2	4	33	5	25
5	28	- 65,1	4243,8	5	11	-17	289
6	14	- 79,1	6263,1	6	22	- 6	36
7	20	- 73,1	5349,4	7	10	-18	324

M 1 : M = 93,1 $\sum (M-P)^2 = 32113,8$

M 1-malato : M = 28,0 $\sum (M-P)^2 = 1622,0$

Para 12 g d l, t = 2,3; SIGNIFICATIVO

3.5 SUSTITUCION DE LA GLUCOSA POR OTRAS FUENTES DE CARBONO Y ENERGIA.

En el presente apartado se citan diversos análisis de la población de C. intermedium C 3 obtenida sobre medios análogos al M 1 en los que la glucosa ha sido sustituida totalmente por xilosa, glicerina, sorbitol o piruvato.

El objetivo inicial de estos experimentos estribaba en mostrar si la glucosa era utilizada selectivamente por los elementos segregadores de glutamato. En este caso, era poco probable que se diera el mismo fenómeno utilizando otros sustratos como los mencionados; entonces, la heterogeneidad colonial desaparecería, no segregándose glutamato, o segregándose por igual. Esta última alternativa era más previsible, - sobre todo para los tres primeros sustratos, que habían sido utilizados ya por GUINEA, encontrando acumulación de aminoácidos en el medio (GUINEA, 1966).

El hecho de que con citrato se produzca una diferenciación fenotípica análoga a la obtenida con glucosa (3.3), señala la existencia de un mecanismo de regulación a nivel - del isocitrato deshidrogenasa, pero las experiencias referidas podrán mostrar si se da alguna otra reacción limitante diferente para las formas sg+ y sg- y relacionada con la segregación de glutamato. Realmente, la segregación de este aminoácido a partir de la glucosa plantea la posibilidad del fallo de

varios mecanismos de regulación implicados en la glucolisis. 3.6

Todas las pruebas de significación estadística de los resultados de los diferentes medios, que se exponen en el presente apartado, se realizan con referencia a los experimentos registrados en el Cuadro 3.6, donde se consignan los análisis coloniales practicados sobre la cepa standard de C. intermedium C 3 después de 24 h de crecimiento a 30^o C en agar-M 1 inclinado.

3.6.1 Xilosa

La xilosa puede ser utilizada por las bacterias como sustrato energético bien a través del ciclo de las pentosas o bien por síntesis de hexosas (WOOD, 1961). Es probable que C. intermedium C 3 utilice preferentemente el segundo camino. En todo caso, dejan de tener valor los sistemas reguladores de la hexosa 6-P y de los que actúan sobre la formación del éster difosfato. Por lo tanto, si algunos de ellos está comprendido en una utilización más rápida de la glucosa en los elementos sg⁺, verosíblemente dejará de manifestarse al sustituirla por la xilosa.

La concentración de la pentosa en el medio de revelado era de 16,666 g/l, equimolar con 20 g/l de glucosa; en el cuadro 3.6.1 se registra un análisis colonial de una -

CUADRO 3.6

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3
 SOBRE AGAR-M 1

Placa	Total colonias	B+C	P(% B+C)	M-P	(M-P) ²
1	39	10	25,6	-16,1	259,2
2	36	14	38,8	- 1,9	3,6
3	49	18	36,7	- 5,0	25,0
4	46	25	54,5	12,8	163,8
5	45	10	22,2	-19,5	380,2
6	18	12	66,6	24,9	620,0
7	40	14	35,0	- 6,7	44,8
8	30	15	50,0	8,3	68,8
9	29	11	37,9	- 3,8	14,4
10	<u>28</u>	<u>14</u>	50,0	8,3	68,8
	370	143			(61% Δ)

$$M = 41,73 \quad \sum (M-P)^2 = 1648,6$$

CUADRO .3.6.1

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3
 SOBRE AGAR M 1-XILOSA

Placa	Total colonias	B+C	P(%B+C)	M-P	(M-P) ²
1	30	11	36,6	-10,0	100,0
2	18	10	55,5	8,9	79,2
3	60	14	23,3	-23,3	542,8
4	44	33	75,0	28,4	806,5
5	13	8	61,5	14,9	222,0
6	39	19	48,7	2,1	4,4
7	15	7	46,6	0,0	0,0
8	<u>54</u>	<u>14</u>	25,9	-20,7	428,4
	273	116			(58 % A)

$$M = 46,6 \quad \sum (M-P)^2 = 2178,9$$

Comparado con los datos del Cuadro 3.6:

$$t = 0,66 \quad \text{NO SIGNIFICATIVO}$$

población de C. intermedium C 3 sobre M 1-xilosa y su comparación estadística con los resultados del Cuadro 3.6.

3.6.2 Glicerina

La glicerina puede ser utilizada por C. intermedium C 3 como única fuente de carbono bajo las condiciones de crecimiento habituales. No obstante, esta cepa fermenta mal la glicerina (PERDIGO, 1969). Este sustrato excluye también las diferencias que puedan existir entre sg+ y sg- en la penetración de la glucosa, etapas anteriores al fosfogliceraldehído y mecanismos de regulación comprendidos en los mismos.

La concentración de glicerina en el medio utilizado era de 10,222 g/l, sustituyendo por completo a la glucosa en el M 1. En el Cuadro 3.6.2 se consignan los resultados de varios análisis coloniales y su comparación estadística con los datos del Cuadro 3.6.

3.6.3 Sorbitol

La fermentación del sorbitol ha sido estudiada especialmente en las propionibacterias (WOOD, 1961); sin -

CUADRO 3.6.2

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3
 SOBRE AGAR M 1-GLICERINA

Placa	Total colonias	B+C	\bar{p} (% B+C)	M-P	$(M-P)^2$
1	18	3	16,6	-22,0	284,0
2	20	8	40,0	1,4	1,9
3	23	11	47,8	9,2	84,6
4	43	24	55,8	17,2	295,8
5	20	8	40,0	1,4	1,9
6	23	13	56,5	17,9	320,4
7	45	12	26,6	-12,0	144,0
8	40	12	30,0	- 8,6	73,9
9	56	21	37,5	- 1,1	1,2
10	<u>31</u>	<u>11</u>	35,4	- 3,2	10,2
	319	123			(62 % A)

$M = 38,62 \quad \sum (M-P)^2 = 1217,2$

Comparado con los datos del Cuadro 3.6:

$t = 0,55$ NO SIGNIFICATIVO

embargo, muchas Enterobacteriaceae son capaces de utili- 3.6.3
zarlo como única fuente de carbono y energía. La susti-
tución de la glucosa por sorbitol en el M 1 representa -
otra posibilidad de anular la heterogeneidad colonial o de
modificarla. En este caso se incluirían mecanismos espe-
ciales para la utilización de glucosa.

En el medio empleado, M 1-sorbitol, éste ha
sustituído por completo a la glucosa, en cantidad equimolar,
es decir, con 20,222 g/l. En el Cuadro 3.6.3 se indican
los resultados de diversos análisis coloniales y su compara-
ción con los datos del revelado en glucosa del Cuadro 3.6.

3.6.4 Piruvato

El piruvato representa otra posibilidad de ha-
cer funcionar el ciclo del ácido cítrico, y con ello la sínte-
sis de glutamato, con independencia de todo sistema regula-
dor no comprendido en los mismos y que pueda afectar la
utilización de glucosa.

El medio utilizado tenía 12,222 g/l de piruvato
sódico en vez de glucosa. El piruvato se esterilizaba por
filtración, tomando las precauciones necesarias para evitar
su descarboxilación durante la preparación del medio. En

CUADRO 3.6.3

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3
 SOBRE AGAR M 1-SORBITOL

Placa	Total colonias	B+C	P (% B+C)	M-P	(M-P) ²
1	44	7	16,9	-21,2	449,4
2	16	6	37,5	- 0,6	0,3
3	18	6	33,3	- 4,8	23,0
4	54	23	42,5	4,4	19,3
5	29	11	37,9	- 0,2	0,0
6	48	21	43,7	5,6	31,3
7	17	6	35,2	- 2,9	8,4
8	17	8	47,0	8,9	79,2
9	16	6	37,5	- 0,6	0,3
10	<u>16</u>	<u>8</u>	50,0	11,9	141,6
	275	102			

(63 % A)

$$M = 38,12 \quad \sum (M-P)^2 = 752,8$$

Comparado con los datos del Cuadro 3.6: $t = 0,69$ NO SIGNIFICATIVO

el Cuadro 3.6.4a se indican los resultados de varios análisis coloniales y su comparación con los datos del Cuadro 3.6, apreciándose que las diferencias de frecuencias de colonias A en el conjunto de los experimentos resultan estadísticamente significativas, siendo un 16% mayor en M 1-piruvato que en M 1. 3.6.4

C. intermedium C 3 se desarrolla muy bien en M 1-piruvato a 30° C, produciendo un crecimiento más abundante que en M 1 para el mismo tiempo de incubación. Esto sugiere que es utilizado más rápidamente que la glucosa.

Estos resultados ponen de manifiesto que utilizando el piruvato como única fuente de carbono y energía en lugar de la glucosa también hay segregación de aminoácidos. Este aserto no había podido ser verificado directamente con anterioridad, debido a que el piruvato interfiere con el método de la sal de cobre para la determinación de aminoácidos, utilizado previamente por CLOTET, GUINEA y PARES - (1969).

En el Cuadro 3.6.4b se indican los resultados de otro experimento, en el que se compara el revelado en M 1 y M 1-piruvato para una misma población derivada de una colonia C. Este experimento fue llevado a cabo simultáneamente con el referido en el Cuadro 3.5.2.2, y como allí los tiempos de incubación a 30° C y el de revelado con L. mesenteroides son más cortos que en el revelado normal. En este caso la diferencia entre las frecuencias de colonias

A con piruvato y glucosa no parecen ser significativas. Es 3.6.4 muy posible que el piruvato tenga una acción análoga a la del malato, si bien cuantitativamente menos importante.

CUADRO 3.6.4a

ANALISIS COLONIAL DE CITROBACTER INTERMEDIUM C 3

SOBRE AGAR M 1-PIRUVATO

Placa	Total colonias	B+C	P (%B+C)	M-P	(P-M) ²
1	29	10	34,4	9,7	94,1
2	15	2	13,3	-11,4	129,9
3	55	13	23,3	- 1,4	1,9
4	56	10	17,8	- 6,9	47,6
5	29	11	37,9	13,2	174,2
6	9	4	44,4	19,7	388,1
7	37	10	26,0	1,3	1,7
8	13	2	15,3	- 9,4	88,3
9	46	10	21,7	- 3,0	9,0
10	<u>22</u>	<u>3</u>	13,6	11,1	123,2
	311	75			(76 % A)

$$M = 41,73$$

$$\sum (M-P)^2 = 1058,0$$

Comparado con los datos del Cuadro 3.6: $t = 3,09$ SIGNIFICATIVO

CUADRO 3.6.4b

HETEROGENEIDAD COLONIAL EN M 1 Y M 1-PIRUVATO
 DE LA POBLACION DE COLONIAS C DE CITROBACTER
INTERMEDIUM C 3

Experimento	Medio M 1			Medio M 1-piruvato				
	Total	A	B	C	Total	A	B	C
1	49	2	23	24	33	0	21	12
2	93	0	48	45	85	3	32	50
3	28	2	15	11	118	3	55	60
Totales	170	4	86	80	236	6	108	122

3.7 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los experimentos referidos en 3.2 ponen de manifiesto que efectivamente el α -cetoglutarato es utilizado por C. intermedium C 3, y que puede serlo como única fuente de carbono. Ambas conclusiones no estaban implícitas en los experimentos verificados anteriormente con este intermediario del ciclo del ácido cítrico (3.2.1 y 3.2.2).

El crecimiento en α -cetoglutarato como única fuente de carbono es más lento que en glucosa, y también que en el medio en el que ésta ha sido sustituida parcialmente por el citado sustrato. De aquí que el periodo de incubación necesario para el revelado tenga que ser de 20 a 25 horas mayor, y que el desarrollo simultáneo de una misma colonia después del traslado por tampones no permita un revelado paralelo.

Habida cuenta de la proporción de elementos sg-, los resultados obtenidos indican que estas células sg- también se desarrollan sobre M 1- α cetoglutarato, teniendo presente la proporción de los mismos en la población de -partida, que es del orden del 50%. Este resultado se sugiere en los mismos revelados llevados a cabo sobre este medio, pero se confirma con los experimentos de calco de colonias. En consecuencia, puede excluirse la posibilidad

de que la uniformidad de colonias corresponda a un desarrollo exclusivo de elementos sg+. Esta condición confirma el supuesto de que el α -catoglutarato produce una fenocopia - (3.1). Por lo demás se corrobora que en presencia de este intermediario la formación de glutamato deja de estar regulada, perdiéndose una cantidad importante del mismo en el medio.

Al parecer, en las células sg- de la población creciendo aeróbicamente, el ciclo del ácido cítrico gira de forma que su actividad catabólica suministra suficiente energía para absorber todas las posibilidades de su acción biosintética. Es completamente verosímil que en este equilibrio estén implicados muchos mecanismos de regulación, tanto de síntesis de enzimas como de actividad de las mismas.

La fracción de elementos segregadores en la población de C. intermedium C 3 representa la existencia de un fallo en alguno o algunos de los sistemas reguladores antes mencionados que afecte a la síntesis de glutamato. Los experimentos referidos en el presente capítulo constituyen una evidencia experimental considerable de que esta regulación está restringida al sistema del isocitrato deshidrogenasa.

La coexistencia de elementos sg+ y sg- en la misma población bacteriana que se desarrolla en M 1 hace suponer que hay un factor endógeno que puede condicionar la desregulación aludida, cuando se encuentra en un estado "activo". Este estado activo sería suficientemente lábil para poder explicar la estabilidad del equilibrio de la población.

4. <u>EFEECTO PARADOJICO DEL ANARANJADO DE</u> <u>ACRIDINA</u>	Pág. 112
4.1 Eliminación de plásmidos con anaranjado de acridina	112
4.2 Efecto del anaranjado de acridina sobre la transferibilidad epidémica y la probabilidad de integración precoz	115
4.3 Material y métodos	118
4.3.1 Cepas utilizadas	118
4.3.2 Medios	119
4.3.3 Preparación del anaranjado de acridina	119
4.3.4 Análisis colonial	121
4.4 Influencia del tamaño de la población inicial y del número de generaciones	122
4.5 Análisis de los resultados	127
4.6 Integración del factor S	131
4.7 Obtención de poblaciones con distinta frecuencia de elementos segregadores	133
4.7.1 Intentos de selección utilizando medios con distinta concentración de cloruro amónico	134
4.7.2 Selección con anaranjado de acridina	138
4.7.2.1 Selección de poblaciones con alta frecuencia de elementos sg ⁺	138
4.7.2.2 Selección de poblaciones no segregadoras	139

4. EFECTO PARADOJICO DEL ANARANJADO DE ACRIDINA.

4.1 ELIMINACION DE PLASMIDOS CON ANARANJADO DE ACRIDINA.

La primera observación sobre el efecto de los colorantes de acridina relativa a la multiplicación del ADN - extracromosómico se refería a la eliminación con acriflavina de los factores citoplásmicos de la levadura, produciendo la mutación "colonia diminuta" (EPHRUSSI et al., 1949). Más tarde, HIROTA e IJIMA (1957) encontraron que la acriflavina podía convertir las células F+ de E. coli K 12 a F-, - por eliminación del factor sexual. En 1960, HIROTA, encontró que el factor F en estado integrado (machos Hfr) no pue

de ser eliminado por las acridinas. El mismo autor señaló 4.1 que el anaranjado de acridina (OA) es la acridina más eficaz para la eliminación del episoma en estado autónomo, - por lo que se refería al factor sexual de E. coli K 12 - (HIROTA, 1960).

WATANABE y FUKASABA (1961) indicaron que los factores de resistencia múltiple a antibióticos de cepas de Shigella flexneri y E. coli pueden ser eliminados - por tratamiento con acridinas. Sin embargo, algunos sólo pueden serlo parcialmente, lo cual sugiere que se hallan en estado integrado o adheridos de algún modo al cromosoma bacteriano. Esta hipótesis está de acuerdo con el resultado encontrado por los mismos autores, en el sentido que - la eliminación de la resistencia es más eficaz después del tratamiento con radiación ultravioleta. Esto plantea la posibilidad de un fenómeno de desintegración del episoma análogo al de la inducción de cepas lisógenas por irradiación ultravioleta; después de lo cual, el efecto de la acridina tiene lugar sobre material preponderantemente autónomo.

WATANABE y FUKASABA han conseguido obtener una cepa de Shigella con resistencia múltiple que da lugar a una descendencia resistente después de tratamiento con OA, pero que no puede transferir la propiedad. Dichos autores han sugerido que los factores de resistencia se hallan en este caso simultáneamente en estado integrado y autónomo (WATANABE y FUKASABA, 1961; WATANABE 1963).

A la inversa de lo señalado por HIROTA con 4.1 relación al factor F, la eliminación de los factores R puede llevarse a cabo más fácilmente con acriflavina que con OA. Los factores R llevan ordinariamente asociados algunos factores de inmunidad con respecto a la adquisición de nuevos factores R. Esto se sugiere de la frecuencia de adquisición de nuevos factores añadidos por infección. Estos factores de inmunidad también se pierden por el tratamiento con acridinas (WATANABE, 1963).

El factor col^r no se pierde tan fácilmente como el factor F por tratamiento con OA. Otros factores col, como col E₁, que requieren la presencia del factor F, denotan el mismo grado de sensibilidad.

Los hechos referidos permiten concluir que la multiplicación del ADN autónomo o extracromosómico puede ser selectivamente inhibida por los colorantes de acridina. Por esto, para probar la localización extracromosómica de una determinada característica hereditaria puede utilizarse el efecto del OA u otros colorantes de acridina. Además, ello puede suministrar una valiosa información acerca de las posibilidades de integración de un plásmido, de acuerdo con la pérdida de sensibilidad al referido tratamiento.

4.2 EFEECTO DEL ANARANJADO DE ACRIDINA SOBRE LA TRANSFERIBILIDAD EPIDEMICA Y LA PROBABILIDAD DE INTEGRACION PRECOZ.

HERNANDEZ (1968) puso de manifiesto que el cambio $sg^- \rightleftharpoons sg^+$ que tiene lugar en la descendencia de una colonia de tipo C de C. intermedium C 3 es sensible a la agitación mecánica. Esta característica, junto a la alta velocidad del cambio antedicho, llevó a la conclusión de que en él tenía lugar un fenómeno de tipo infeccioso, debido a cierto material genético que podía pasar de célula a célula con independencia de la división celular.

Si este factor infeccioso era ADN extracromosómico de tipo episómico, debería ser sensible al tratamiento con OA. De acuerdo con esta previsión, HERNANDEZ encontró que el cambio $sg^- \rightleftharpoons sg^+$ en el desarrollo de una colonia C, quedaba suprimido en presencia de OA por un número considerable de generaciones. Aparte de la confirmación del carácter plasmídico del factor implicado en dicho cambio, los experimentos referidos mostraron que un cierto grado de multiplicación del mismo, también muy superior a la velocidad de multiplicación celular, era una condición concomitante necesaria.

De todos modos, los experimentos de HERNAN-

DEZ representaban un caso muy particular. Se estudiaba 4.2 el efecto del 0A en poblaciones derivadas de colonias C y sólo durante el intervalo de unas 10 generaciones. En realidad, se requerían experimentos adicionales para poder llegar a una conclusión general sobre el efecto del 0A en el factor de segregación de glutamato en la población de C. intermedium C 3. En el presente capítulo se consignan una serie de trabajos experimentales que tienen como punto de partida esta perspectiva.

Los experimentos de HERNANDEZ presentan también ciertas limitaciones en cuanto a la determinación de las propiedades generales del factor S en relación a su transferibilidad célula-célula. Posteriormente, PARES y GUI-NEA (1969) han encontrado que la población de las colonias C es capaz de transferir más eficazmente el episoma a - otras bacterias que la población standard, o incluso que las colonias A. Estos hechos no serán detalladamente examinados en esta memoria, pero conviene enunciarlos, ya que sugieren una profunda analogía con los factores R y col, que se transfieren mucho más eficazmente a partir de las células recién infectadas.

El fenómeno de la transferibilidad epidémica obedece a causas hasta ahora no bien definidas; por esto, resulta interesante relacionar la capacidad de transferencia del factor S con los distintos tipos de células sg-, los cuales - pueden caracterizar diferentes tipos de poblaciones de C. intermedium C 3. Estas células pueden ser: 1) células sg- de la población normal, 2) células sg- de una colonia C, y

3) células sg- subsecuentes al tratamiento con 0A. Al pa- 4.2
recer, hay un mecanismo de tipo represor que bloquea la
transferencia y que sólo se desarrolla después de una se-
rie de generaciones siguientes a la entrada del ADN plas-
mídico. Este mecanismo volvería a reprimirse como con-
secuencia de un sistema de inmunidad dependiente de la -
integración. Según éste, después de desintegrarse existi-
ría una fase de susceptibilidad que comprendería tanto la -
capacidad de entrada de material extracromosómico, como
la de transferibilidad una vez que se hubiese multiplicado.

Todos los hechos relativos al análisis colonial
de la heterogeneidad de la población de C. intermedium C 3
llevaban a la conclusión de que la segregación de glutamato
en esta cepa era consecuencia de la integración de un epi-
soma (HERNANDEZ, 1968; GUERRERO y PARES, -
1969b y c). En este capítulo se ponen de manifiesto diver-
sas experiencias cuyo resultado depende directamente de la
integración del factor S, las cuales constituyen el objetivo
esencial tratado.

El término episoma fue utilizado por primera
vez por THOMPSON (1931) y sólo más tarde, en un sen-
tido bastante distinto por JACOB y WOLLMAN (1958). Los
plásmidos quedan definidos en todo caso como un material -
genético accesorio (SCAIFE, 1967). Las dificultades en -
conseguir eliminar el factor S con 0A y el efecto de este -
colorante sobre el tiempo de generación de las células plan-
tean algunas dudas al respecto.

Por otra parte, la regresión al equilibrio $sg^+ \rightleftharpoons sg^-$

es distinta cuando se lleva a cabo desde una colonia C que 4.2
cuando se hace desde una población tratada con 0A. Este
fenómeno es probablemente muy complejo, pero hasta ahora
parece sin duda relacionado con el número de episomas por
célula. Los elementos sometidos al tratamiento con 0A pue
den tener muy pocos episomas y requerirán muchas genera
ciones antes de que se den las circunstancias que permitan
el equilibrio antedicho.

4.3 MATERIAL Y METODOS

En los experimentos descritos en el presente
capítulo se ensayó el efecto del 0A sobre la posible varia
ción de los resultados del análisis colonial en cuanto a la -
segregación de glutamato de C. intermedium C 3.

4.3.1 Cepas utilizadas

En la mayor parte de los experimentos que se
citarán a continuación se partía de poblaciones procedentes
de la dilución correspondiente de colonias C, dispersadas en
Ringer 1/4, de Citrobacter intermedium C 3. Las colonias

se obtenían por revelado, según se especifica en 2.1.3.1. 4.3.1
En algunas de las primeras experiencias se utilizaba la -
población standard de C. intermedium C 3, la cual proce-
día de un cultivo de 24 h a 30º C en agar-M 1 inclinado.

Para el revelado de las colonias se empleaba
la cepa auxotrófica P 60 de Leuconostoc mesenteroides -
(ATCC 8042) referida en 2.1.3.1.

4.3.2 Medios

El mantenimiento de la cepa standard de C.
intermedium C 3 se realizaba en agar-M* 1 inclinado a -
30º C (Vid. 2.1.2.3).

El mantenimiento de L. mesenteroides P 60
se llevaba a cabo por resiembras sucesivas a 37º C en
el medio Bacto-Glutamic Inoculum Broth solidificado con un
1 % de agar, tal como se especifica en 2.1.3.1, epígrafe 5-1.

4.3.3 Preparación del anaranjado de acrídina.

La incubación de la población de C. interme-
dium C 3 se realizaba en tubos con 10 ml de M 1 líquido

a 30°C. A estos tubos se había añadido 0,1 ml de una solución de OA preparada según el siguiente procedimiento: 4.3.3

1./ Se esteriliza previamente, 10 min a 121°C, todo el material que entrará en contacto con el OA: vaso de precipitado de 25 ml, varilla de vidrio, espátula, matraz aforado topacio de 10 ml y matraz con 12-14 ml de agua - destilada.

2./ Se pesan 40 mg de anaranjado de acridina - Schuchardt, en las condiciones más asépticas posibles.

3./ Se diluye lentamente la cantidad de OA en 10 ml de agua destilada esterilizada previamente. Esta operación se lleva a cabo en la oscuridad. La dilución efectuada es la solución madre de OA, con una concentración de 4 mg/ml del colorante. Esta solución puede conservarse a temperatura ambiente durante varias semanas, con la única precaución de mantenerla en completa oscuridad.

En diversas ocasiones se hicieron controles de esterilidad, extendiendo dos o tres mililitros de la solución de OA sobre placas de agar nutritivo. En todos los casos el resultado fue negativo, demostrando la esterilidad de la solución después del proceso descrito.

4./ Antes de realizar la incubación de las bacterias en M 1 líquido, se añadía a éste 0,1 ml de la solución de OA, quedando una concentración final de 40 µg/ml. Los tubos se protegían de la luz introduciéndolos en unas fundas

de aluminio de diámetro similar. Después de hecho esto 4.3.3 se inoculaban y se cerraban en la estufa.

La concentración óptima de actuación del OA se calculó basándose en que debía ser la mitad aproximadamente de la concentración mínima inhibidora, para que no afectase la multiplicación del cromosoma bacteriano pero sí la del ADN extracromosómico (ROTH, 1967). La concentración mínima inhibidora se estimó, después de varios ensayos, en 100 μ /ml de OA, al menos para las primeras 48 h de incubación en M 1 a 30^o C. Se comprobó también que la concentración de 50-60 μ /ml de OA no afectaba el crecimiento de C. intermedium C 3 de modo apreciable. En algunos de los experimentos se emplearon varias concentraciones de OA entre 20 y 50 μ g/ml como en el detallado en el Cuadro 4.4.A (exp. n.0)

4.3.4 Análisis colonial

Se llevó a cabo con las mismas condiciones y métodos descritos en 2.1.3.1. Los medios utilizados fueron agar-M 1 y Bacto-Glutamic Acid Assay Medium, citados en 2.1.2.3.

4.4. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LA POBLACION INICIAL Y DEL NUMERO DE GENERACIONES.

En la Figura 4.4a se esquematiza el proceso seguido en el desarrollo del experimento de ensayo del efecto del 0A partiendo de grandes inóculos, y en la Figura 4.4b, a partir de pequeños inóculos y tiempo breve de incubación.

En los Cuadros 4.4A a 4.4B se expresan los resultados de los diversos análisis coloniales efectuados sobre poblaciones incubadas en M 1 líquido con y sin 0A. La numeración de los experimentos, 0, 00, 1, 2, ..., y 8 indica el orden cronológico en que fueron realizados. En los citados cuadros se destaca claramente la proporción de aumento y disminución de la fracción de colonias A según las condiciones del cultivo.

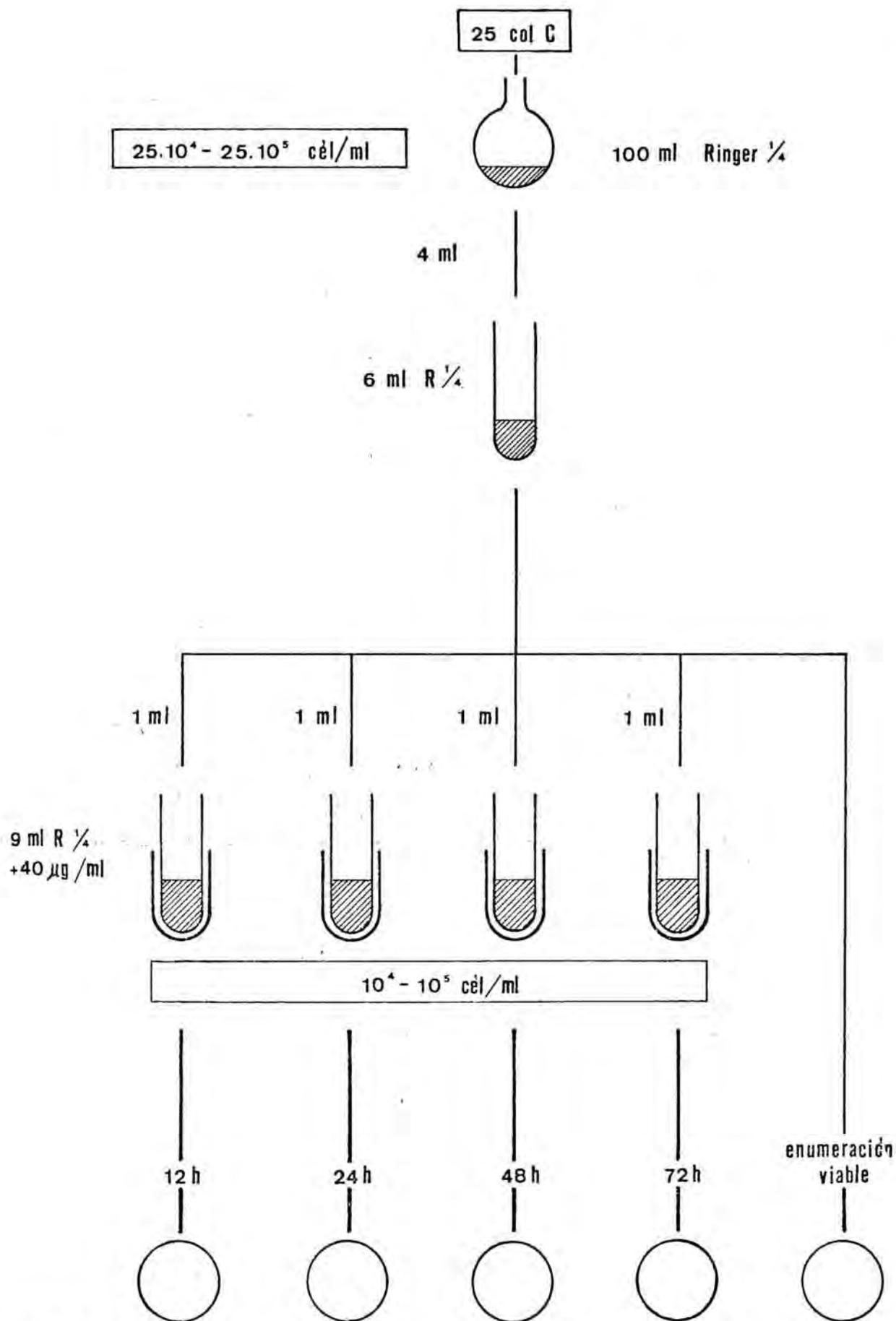


FIGURA 4.4a Tratamiento con anaranjado de acridina de grandes poblaciones de C. intermedium C 3. Tiempos variables de incubación en agar-M 1.

CUADRO 4.4A

ANALISIS COLONIAL DE C. INTERMEDIUM C 3 DESPUES DEL TRATAMIENTO CON ANA-
RANJADO DE ACRIDINA

Experimentos caracterizados por emplear gran inóculo (10^5 células/ml). Tiempo incubación 12-72 h.

	<u>n.0</u>	<u>n.00</u>	<u>Experimento n. 1</u>	<u>Experimento n.5</u>	<u>Experimento n.6</u>	<u>Experimento n. 7</u>
	0A	0A	0A	--	0A	--
N. de placas	4	4	14	6	5	6
N. total col.	235	86	366	87	42	58
N. col. A	175	50	252	38	5	16
Frec. A, en %	74,5	58,1	68,8	43,6	11,9	27,6
					28,5	38,7
					51,9	47,2
					106	106
					54	50
					6	6
					0A	--
					0A	--

Promedio del aumento de la fracción de colonias A: 24,63 %

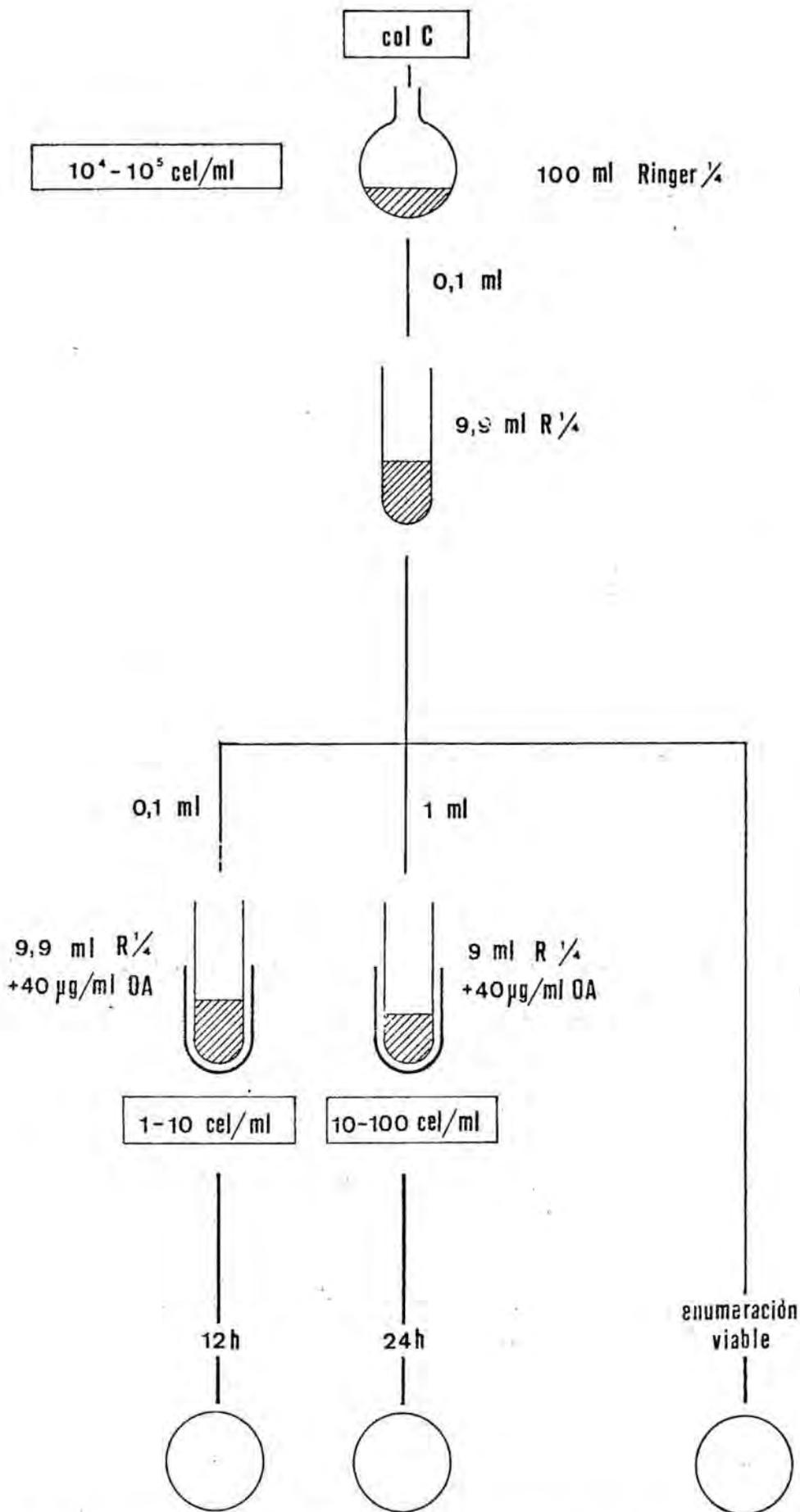


FIGURA 4.4b Tratamiento con anaranjado de acridina de pequeñas poblaciones de C. intermedium C 3.

CUADRO 4.4B

ANALISIS COLONIAL DE C. INTERMEDIUM C 3 DESPUES DEL TRATAMIENTO CON ANA-
RANJADO DE ACRIDINA

Experimentos caracterizados por emplear pequeño inóculo (1-100 células/ml). Tiempo incubación 12 h.

	<u>Experimento n. 2</u>	<u>Experimento n. 3</u>	<u>Experimento n. 4</u>	<u>Experimento n. 8</u>
	0A ---	0A ---	0A ---	0A ---
N. de placas	5	5	4	6
N. total col.	25	188	66	127
N. col. A	1	74	8	7
Frec. A. en %	4,0	39,3	12,1	5,5
			31,2	52,0
				0
				58
				108
				6
				0
				53,7

Promedio de la reducción de la fracción de colonias A : 87,74 %

4.5 ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los experimentos descritos en el apartado anterior ponen de manifiesto que el efecto del 0A sobre la frecuencia de elementos sg^+ en la población es dependiente del tamaño de la población de partida.

Dando por establecido el carácter episómico del factor S, cabía esperar que el 0A podía eliminar este factor en mayor o menor proporción, y consecuentemente que la frecuencia de colonias A en la descendencia disminuiría (4.1) Los experimentos de HERNANDEZ (1968) venían a indicar que realmente ocurría así, por lo menos dentro de las 10 primeras generaciones del desarrollo de una fracción de colonia C.

El efecto del 0A sobre el desarrollo de inóculos relativamente grandes resultó aparentemente contradictorio, razón por la cual se le denominó "efecto paradójico" (GUERRERO y PARES, 1969a). Además, hay que tener presente que las experiencias que fueron llevadas a cabo en primer lugar son las de los n^{os}. 0 y 00 y que la correspondiente al n^o 2 constituye una comprobación de que la clave del efecto paradójico se halla en el volumen del inóculo.

En la Figura 4.4b se esquematiza la marcha 4.5 seguida en los experimentos de HERNANDEZ que incluían desarrollo con 0A. De ellos puede deducirse que durante las 12 primeras horas de incubación no ha tenido lugar el cambio $sg^- \rightarrow sg^+$ que ocurre sin la intervención del 0A. Además, los valores negativos son un indicio de que la probabilidad de que una célula sg^- dé una colonia A disminuye cuando aquélla ha sido tratada con 0A. En estos resultados se encuentran los primeros indicios de que el número de episomas por célula debe de ser superior a la unidad, puesto que el subcultivo da siempre poblaciones en las que se restablece el equilibrio. Esta conclusión está avalada por el hecho de que el mismo HERNANDEZ comprobó que la referida probabilidad no se modificaba por agitación mecánica, en tanto que se inhibía igualmente el cambio $sg^- \rightarrow sg^+$.

De acuerdo con el esquema de la Figura 4.4a después de 24 h de incubación en 0A de una población inicial de 10^5 células/ml se encuentran frecuencias de colonias A claramente superiores a las obtenidas en M 1 sin 0A.

Aparte del tiempo de incubación mayor, la única diferencia entre los dos tipos de experimentos es el volumen del inóculo, que en los de HERNANDEZ es extraordinariamente pequeño lo cual fue dispuesto simplemente para adecuar los crecimientos al método de determinación de \underline{a} por la frecuencia de colonias A en poblaciones iguales de diferente número de generaciones. Los resultados consignados en el Cuadro 4.4B constituyen una comprobación de que al utilizar un inóculo pequeño vuelven a reproducirse los efec-

Es posible imaginar tres tipos de células como probables componentes de la población de una colonia C: 1) células con episoma autónomo, 2) células sin episoma, y 3) células con episoma integrado. En realidad, dicho supuesto no presupone una diferencia esencial con otro en el que 1 y 2 fueran células con muchos y pocos episomas. De hecho, lo que es esencial, es que la probabilidad de formarse una célula del tipo 3 no es la misma para todos los elementos sg-.

Por efecto del 0A, en una primera aproximación, las células 1 pasarían a 2, mientras que las 3 no se modificarían, porque el 0A no afecta selectivamente la multiplicación del episoma integrado. Si las células supuestamente sin episoma o con muy pocos episomas se multiplican más lentamente en M 1 que las células con el episoma integrado la frecuencia de estas últimas irá aumentando. Esto puede ser lo que ocurra en un gran inóculo, en el que inicialmente ya hay algún elemento sg+.

De ser cierta la hipótesis referida, el 0A proporciona la posibilidad de seleccionar la población de C. intermedium C 3 en favor de los elementos segregadores, que por cultivo sucesivo con colorante podrían llegar a constituir la mayor parte de la población.

La población obtenida a partir de un pequeño inóculo presenta una fracción de elementos no segregadores superior a la normal, y es previsible que con adecuadas

precauciones pueda llegar a constituir el 100 % de las células. No obstante, estas células no pueden considerarse equivalentes a las sg- de la población normal, por cuanto, como antes ha sido señalado, no tienen la misma probabilidad de convertirse en un elemento segregador. En relación a la propiedad de segregar glutamato, tenemos pues los siguientes tipos de poblaciones de C. intermedium C 3:

1º, colonia C, y descendencia de la misma a lo largo de un tiempo de generación relativamente pequeño. Por agitación mecánica presenta una fracción de elementos sg+ nula o muy reducida.

2º, colonia A.

3º, colonia B.

4º, población seleccionada con 0A en favor de los elementos segregadores, con frecuencias de colonias A significativamente superiores al 60%. En ellas, los elementos sg+ son mucho más abundantes que en la población standard.

y 5º, población seleccionada con 0A, con frecuencias de A nulas o significativamente inferiores al 60% en la cual se encuentran pocas células sg+ y células sg- con una probabilidad de convertirse en segregadoras mucho menor que la de las células correspondientes del cultivo normal.

Este 5º tipo deja abierta una nueva posibilidad de obtener elementos sg- libres de episomas, que por sucesivos subcultivos no darían ninguna colonia A por análisis colonial. (Vid. 5.7).

4.6 INTEGRACION DEL FACTOR S

La primera indicación de que el factor S pudiera hallarse en estado integrado en el cromosoma bacteriano se deriva del hecho de que los individuos sg- de la población standard pueden dar siempre individuos sg+. Entonces, la alta probabilidad de integración que supone la velocidad - del cambio sg- \rightarrow sg+ conduciría a pensar que el factor S contiene alguna parte con fuerte homología con uno o varios loci del cromosoma bacteriano (Vid. SCAIFE, 1967; DAVIS et al., 1967). Por la misma razón, el estado integrado tiene una baja estabilidad, de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio del equilibrio (HERNANDEZ, 1968).

De acuerdo con los datos disponibles con anterioridad al estudio del efecto del 0A, el modelo expuesto es igualmente válido que otro alternativo en el cual el episoma estuviera integrado en las formas sg-. Lo único que parecía necesario era el admitir los dos estados.

Después de los experimentos de HERNANDEZ, sólo parecía aceptable el primer modelo referido. Sin embargo, la confirmación directa de que las formas sg+ poseen el

factor S en estado integrado se halla en el hecho de que no sea sensible al 0A, y como consecuencia de ello pueda ser seleccionado. 4.6

Anteriormente se ha señalado (4.5) que la posibilidad de selección en M 1 depende de que los elementos sg+ crezcan más rápidamente que los sg-. Al disponer de poblaciones seleccionadas de los tipos 4º y 5º se han podido medir los tiempos de generación respectivos. Naturalmente que estos tiempos serán distintos según la selección conseguida, pero el cambio es muy importante, ya que el crecimiento aparente de 24 h en M 1 de la cepa standard se consigue en 12-16 h con las poblaciones seleccionadas en favor de los elementos segregadores, denominadas poblaciones S sg+.

Por otra parte, las poblaciones seleccionadas en favor de los elementos sg-, denominadas S sg-, crecerán con dificultad en M 1, requiriendo varios días de incubación para conseguir desarrollos equivalentes. Una determinación del tiempo de generación en dos cultivos de 24 h en M 1 con 0A, iniciados respectivamente con 1-10 células y 10^4 células por mililitro, dieron 1,25 h y 0,90 h.

4.7 OBTENCION DE POBLACIONES CON DISTINTA FRECUENCIA DE ELEMENTOS SEGREGADORES.

La separación de las formas sg^- y sg^+ fue un problema planteado desde el mismo momento en que se descubrió la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3. Dado el tamaño aparente de las colonias C y A, GUINEA (1966) consideró que en M 1 ambos tipos de células debían de multiplicarse a velocidades muy parecidas. Esto es principalmente consecuencia de que las colonias desarrolladas tienen siempre elementos de los dos tipos, en el momento del revelado; sólo difieren en su origen, pero dada la alta velocidad del cambio $sg^- \rightleftharpoons sg^+$ y el número de generaciones transcurrido para la formación de la colonia, debe esperarse el resultado indicado.

Una verificación directa se ha conseguido a través de experimentos de irradiación con luz ultravioleta, como se señala en 5.3.1.

Los intentos sistemáticos de obtener la separación de los dos tipos celulares pueden resumirse en tres líneas de trabajo: 1) subcultivo de colonias C, 2) modificación del medio de cultivo, y 3) utilización del anaranjado de acridina.

El primer método ha dado siempre resultados negativos, aunque ha sido ensayado por casi todos los que han trabajado con C. intermedium C 3 en el mismo Departa

mento. El segundo está representado principalmente por 4.7 los ensayos de sustitución de la glucosa por otros sustratos (3.2, 3.3, 3.5 y 3.6), pero se han realizado además una serie de experimentos variando la concentración de NH_4Cl , como se describe a continuación. Finalmente, el tercer método se basa en lo señalado en los apartados anteriores, y se detalla más adelante (4.7.2).

4.7.1 Intentos de selección utilizando medios con distinta concentración de cloruro amónico.

La concentración de NH_4Cl en el medio M 1 era relativamente alta en relación al amoníaco utilizado para el crecimiento total, y comparado con los medios usuales en los que se utiliza como única fuente de N. Esto hizo pensar, desde hace tiempo, que la segregación de aminoácidos por C. intermedium C 3 dependía de algún modo de la concentración de NH_4Cl . CLOTET (1967) lo estudió como factor crítico para la producción óptima de aminoácidos, encontrando que la preparación del inóculo en M 1 (7 g/l) previa al crecimiento en un medio con 14 g/l daba los valores más altos de aminoácidos en el medio y de producción específica. El significado de este resultado a nivel de la composición de la población en elementos sg+ ha sido estudiado posteriormente por URGELL (1970).

Independientemente y con posterioridad a los 4.7.1 experimentos que se describen en la presente memoria, - HERNANDEZ (1968) llevó a cabo revelados de la población de colonias C simultáneamente en medios con 7 g/l y 1 g/l de NH_4Cl , encontrando un número más elevado de colonias C en este último. Por otra parte, el traslado - por calco de medio con 7 g/l a medio con 1 g/l muestra después del revelado que las colonias A en el primero - son en su mayoría C en el segundo. Estos resultados son difíciles de interpretar, porque el tamaño de las colonias es menor en el medio con 1 g/l, para el tiempo habitual de incubación, pero sugieren que la segregación de glutamato tiene una expresión dependiente de la concentración de NH_4Cl en el medio.

Una mejor comprensión del efecto del NH_4Cl se ha conseguido gracias a los resultados de URGELL - (1970). Sin embargo, los hechos conocidos con anterioridad plantearon la posibilidad de examinar el posible efecto - selectivo del NH_4Cl sobre las células sg^+ .

Se utilizaron tres medios de crecimiento que diferían solamente en la concentración de NH_4Cl : 1º) medio M 1, 7 g/l; 2º) medio M 2, con 1,4 g/l; y 3º) medio M 3, con 14 g/l. Los demás componentes de los medios eran: glucosa, 20 g/l; KH_2PO_4 , 1 g/l; y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, - 0,5 g/l (Vid. 2.1.2.3).

A partir de una colonia C, se sembró la dilución adecuada en tubos con 10 ml de cada uno de los me-

dios. Se incubaban a 30^o C y se pasaban a medio fresco 4.7.1
cada 48 h. Después de unas 45 resiembras en medio lí-
quido -aproximadamente tres meses- se sembraban en pla-
cas de agar-M 1 haciendo las diluciones correspondientes.

Se llevaba a cabo el análisis colonial de la
segregación de glutamato por revelado con L. mesenteroides
P 60 (2.1.3.1).

Las colonias crecidas en las placas de agar-
M 1 de cada una de las tres series subcultivadas repetida-
mente en M 1, M 2 y M 3, no mostraban diferencias impor-
tantes en aspecto, tiempo de incubación necesario para alcan-
zar igual tamaño, resultados en la proporción de colonias A
después del revelado, ni tamaño aparente de los halos de -
L. mesenteroides -aunque la siembra en placas con esos -
diversos medios, independientemente de la procedencia de la
población, sí produce ligeras modificaciones aparentes.

Por tanto, puede concluirse que, hasta donde
pueden alcanzar las condiciones de los experimentos realiza-
dos, la concentración de NH₄Cl no es un factor selectivo de
los elementos sg⁺ o sg⁻, ni favorece el incremento de la -
frecuencia de cualquiera de ellos en el medio de cultivo (Cua-
dro 4.7.1).

CUADRO 4.7.1

ANALISIS COLONIAL DE C. INTERMEDIUM C 3 INCUBADA REPETIDAMENTE EN MEDIOS CON DIFERENTE CONCENTRACION DE NH_4Cl

Medio	Placa	Total Colonias	B+C	P (%B+C)	M-P	(M-P) ²
M 1 (7 g/l NH_4Cl)	1	20	0	0	-30,5	930
	2	17	3	17,6	-12,9	166
	3	13	7	53,8	23,3	543
	4	28	5	17,8	-17,7	314
	5	27	17	62,9	32,4	1050
M 2 (1,4 g/l NH_4Cl)	1	48	20	41,6	- 3,1	9,6
	2	46	17	36,9	- 7,8	60,8
	3	12	12	100	55,3	3058
	4	26	10	38,4	- 6,3	39,6
M 3 (14 g/l NH_4Cl)	1	14	0	0	-27,1	718
	2	16	0	0	-27,1	718
	3	18	2	11,0	-16,1	258
	4	14	10	71,5	44,4	1960
	5	13	5	38,5	11,4	160
	6	28	11	39,3	12,2	148

M 1 : media, 30,5; $\sum(M-P)^2 = 3013$

M 2 : media, 44,7; $\sum(M-P)^2 = 3168$

M 3 : media, 27,1; $\sum(M-P)^2 = 3962$

\underline{t} para M 1-M 2: 0,717, NO SIGNIFICATIVO

\underline{t} para M 1-M 3: 0,202, NO SIGNIFICATIVO

4.7.2 Selección con anaranjado de acridina.

Tomando como base los resultados consignados en 4.4 se ha preparado una técnica de obtención de poblaciones muy ricas en elementos sg^+ , $S\ sg^+$, y de poblaciones no segregadoras, $S\ sg^-$ después de crecimiento en M 1 con OA. En la puesta a punto de esta técnica ha contribuido especialmente VALOIX (1969a) quien ha suministrado en diversas ocasiones la población que ha servido para llevar a cabo los experimentos de irradiación ultravioleta.

4.7.2.1 Selección de poblaciones con alta frecuencia de elementos sg^+ .

La técnica realizada para obtener poblaciones $S\ sg^+$ consiste en lo siguiente:

1./ Se escoge una colonia C de 24 h de incubación a 30°C y 30 h a 37°C ; una colonia de estas condiciones tiene un número de células viables entre 10^6 y 10^7 . La colonia se reparte en un tubo con 10 ml de Ringer 1/4.

2./ Se añade 1 ml de ese tubo a otro, que contiene 9 ml de M 1 con $40\ \mu\text{g/ml}$ de OA. Se hace, por tanto, un inóculo de 10^4 - 10^5 células/ml. Esta operación debe realizarse en la mayor oscuridad posible, y manteniendo convenientemente tapado el tubo.

2 bis./ Debe efectuarse un control de la población 4.7.2.1
inoculada. Se hace extendiendo en placas de agar-M 1
la dilución adecuada del inóculo para que salgan a'rededor
de 100 colonias por placa.

3./ El tubo inoculado se mantiene durante 24 h
a 30° C, en la oscuridad, y se resiembra en las mismas
condiciones descritas, pasando cada vez 0,1 ml del conte-
nido del tubo incubado al siguiente, preparado de antemano
y con 0A.

En cada inoculación se efectúa un control
de la población, diluyendo convenientemente y sembrando en
agar-M 1.

4./ La proporción de elementos sg+ va aumen-
tando con las sucesivas resiembras, bastando 10 ó 12 pa-
ra alcanzar valores de más del 90 % de colonias A por ul
terior análisis colonial de la población.

4.7.2.2 Selección de poblaciones no segregadoras.

La técnica seguida para obtener poblaciones
S sg-, con valores de A inferiores al 10 %, se realiza si-
guiendo el mismo principio, pero no llega a tener éxito en
todos los casos porque si la población alcanza un cierto ta-
maño crítico antes de que se haya operado suficientemente
la selección algunos elementos sg+ que decantan el proceso

en el sentido contrario al buscado. Los pasos fundamen- 4.7.2.2
tales de la selección en favor de las formas sg- son los
siguientes:

1./ Igual que para la selección de S sg+, pe-
ro de la colonia repartida en Ringer 1/4 se hace una di-
lución de 10^{-3} .

2./ 0,1 ml de esa dilución se reparte en un -
tubo que contiene 9,9 ml de M 1 con 40 μ g/ml de OA. Se
hace, por tanto, un inóculo de 1-10 células/ml. Iguales
precauciones que para la selección de S sg+.

2 bis./ Se lleva a cabo un control de la población,
extendiendo 0,1 ml de la misma dilución en placas de agar
nutritivo. En este medio, C. intermedium C 3 crece mu-
cho más rápidamente que en M 1, y de esta forma es po-
sible saber a las 12 h el número de células inoculadas, lo
cual, en agar-M 1, no sería factible en tan corto plazo de
tiempo.

3./ A las 12 h se resiembra en medio fresco
de M 1 con OA. Según el número de células inoculadas,
observado por la aparición de colonias puntiformes en -
agar nutritivo, se pasa al tubo siguiente entre 1 ml y 0,1
ml, en razón inversa del tamaño del inóculo.

Se vuelve a hacer un control del inóculo
sembrando en agar nutritivo.

4./ Esta operación se puede realizar en total 4.7.2.2 unas tres o cuatro veces, resemebrando cada 12 h. En todos los casos se intenta mantener una población de tamaño muy bajo y casi constante, procurando que la dilución efectuada con cada resiembra coincida con el incremento debido a la multiplicación celular.

La población final de S sg- suele ser muy reducida, entre 10 y 100 células por mililitro, por lo que, caso de necesitarse un número mayor de células, -como ocurre en los experimentos de irradiación ultravioleta, - donde es precisa una concentración entre 10^4 y 10^5 células/ml, (Vid. 5.2.1)- debe añadirse la siguiente operación:

5-1./ Se siembra 0,1 ml del último cultivo de 12 h en M 1 con 0A en placas de agar-M 1. Puede hacerse previamente la dilución 1/4 a 1/2.

5-2./ Las placas se incuban a 30° C durante 24 h. Se revelan las colonias aparecidas con L. mesenteroides, incubándose a 37° C.

5-3./ Después de 24 h se toma una colonia C -suelen serlo la mayoría-, y se hace la dilución adecuada para obtener 10^4 - 10^5 células por mililitro.

5. <u>IRRADIACION ULTRAVIOLETA Y RESTAURACION</u>	Pág. 143
5.1 Episomas y lesión fotoquímica del ADN ...	143
5.2 Material y métodos	146
5.2.1 Tipos de poblaciones irradiadas ...	146
5.2.2 Selección de poblaciones con 0A ...	148
5.2.3 Técnica de irradiación	148
5.2.4 Curvas de supervivencia a tiempos crecientes de irradiación	152
5.2.5 Fotorreactivación y reactivación negra	152
5.3 Efecto del factor S sobre la susceptibilidad a la rUV	153
5.3.1 Respuesta de las colonias A y C ...	153
5.3.2 Sensibilidad y frecuencia de los elementos sg ⁺ en la población	155
5.4 Fotorreactivación	158
5.4.1 Colonias A y C '... ..	158
5.4.2 Poblaciones con distinta frecuencia de elementos sg ⁺	162
5.5 Reactivación negra	165
5.5.1 Colonias A y C	166
5.5.2 Poblaciones con distinta frecuencia de elementos sg ⁺	166
5.6 Análisis colonial de las poblaciones irradiadas	173
5.6.1 Efecto directo de la rUV sobre la frecuencia de colonias A	174
5.6.2 Frecuencia de colonias A después de fotorreactivación	177
5.6.3 Frecuencia de colonias A después de reactivación negra	179
5.6.4 Identificación de las colonias C resultantes de la rUV	181
5.7 Discusión y conclusiones	183

5. IRRADIACION ULTRAVIOLETA Y RESTAURACION

5.1 EPISOMAS Y LESION FOTOQUIMICA DEL A D N

Los efectos de la irradiación ultravioleta (rUV) sobre las bacterias se deben fundamentalmente a su acción sobre el ADN. Por lo que se sabe, el efecto más importante es la hidratación de las pirimidinas a nivel del enlace 5-6. Con ello, tiene lugar la formación de dímeros entre restos timínicos adyacentes. También pueden producirse entre restos pertenecientes a las dos hélices de la misma molécula. Con mucha menor importancia cuantitativa pueden darse otros efectos, tales como puentes ADN-proteína y rotura de la cadena de ADN (HAYES, 1968; SMITH y HANA - WALT, 1969).

Los dímeros formados por efecto de la rUV bloquean la reduplicación del ácido nucleico, en unos casos

porque no puede encontrarse la base adecuada para la 5.1
continuación de la síntesis de la cadena, y en otros por
que las dos cadenas complementarias no pueden separar
se (SETLOW y CARRIER, 1966).

La dimerización no puede realizarse sin -
alguna distorsión de la doble hélice. Tales distorsiones
pueden bloquear la adecuada función de los polimerasas -
del DNA y del RNA, de tal modo que la transcripción -
y la reduplicación quedan detenidas. Sin embargo, las -
células bacterianas normales están equipadas con mecanis
mos que pueden reconocer y reparar esos daños hasta -
un alto grado. La reparación es de naturaleza enzimática
y en algunas bacterias se han demostrado al menos -
cuatro loci genéticos que son operativos en la reparación.
Uno de ellos determina la producción del enzima de foto-
reactivación -que escinde los dímeros sólo cuando es -
irradiado con luz visible- y los otros tres cooperan en el
proceso de reactivación negra -que no necesita luz para
funcionar.

La rUV afecta tanto al ADN cromosómico
como al que puede hallarse en el citoplasma bajo la forma
de un elemento autónomo. Sin embargo, en principio no
cabe esperar ninguna acción letal debida a los cambios ex
perimentados en el ADN plasmídico porque no es esencial
para la viabilidad de la célula (CAMPBELL, 1969).

En cambio se han encontrado algunos facto

res col y R que confieren una protección parcial frente a 5.1 los efectos bactericidas de la rUV. En otros casos, el factor R puede aumentar la sensibilidad o ser totalmente indiferente (HOWARTH, 1965 y 1966; DRABBLE y STOCKER, 1968; MARSH Y SMITH, 1969; SICCARDI, 1969).

Bajo la perspectiva referida, pueden esperarse varios efectos de la rUV sobre C. intermedium C 3 dependientes de la presencia del factor S. Existiría la posibilidad de encontrar una supervivencia diferencial en relación con la riqueza de elementos sg^+ de las poblaciones manejables de C. intermedium C 3. Paralelamente a lo que ocurre con otros plásmidos, se trata de verificar si el factor S puede de algún modo intervenir en la restauración del ADN extracromosómico.

En los casos antes referidos se estudia el efecto de la rUV sobre células con factores episómicos - en estado libre. Las poblaciones de C. intermedium C 3 con muchos elementos con el factor S presumiblemente integrado, pueden presentar un comportamiento diferente con respecto al de aquéllas en las que el factor S se encuentra fundamentalmente en estado plasmático. Incluso en estas últimas, puede ensayarse el efecto de la irradiación entre poblaciones normales y otras en las cuales la concentración de plásmidos libres por célula habrá disminuido seguramente a causa de la preincubación en 0A.

Anteriormente se ha considerado que la di-

5.1
ficultad de obtener desarrollo de C. intermedium C 3 to talmente libre de plásmido en agar-M 1 puede estar relacionada con una función imprescindible del mismo, dentro de la célula (4.2). Esta diferencia puede estar ligada al crecimiento en este particular medio de cultivo, y no constituir un rasgo esencial del factor S distinto al de los otros materiales plasmídicos conocidos. No obstante, dada esta circunstancia, existe también la posibilidad de encontrar alguna acción letal de la rUV debida exclusivamente a su efecto sobre el ADN extracromosómico.

El presente capítulo de esta memoria contiene la descripción de los experimentos llevados a cabo de acuerdo con estas ideas y el correspondiente análisis de los resultados. Aunque no debe considerarse una exploración exhaustiva de las posibilidades de análisis vislumbradas, sino el punto de partida de un nuevo camino a través del cual parece plausible profundizar en el conocimiento de la delicada y compleja significación genética del factor S.

5.2 MATERIAL Y METODOS

5.2.1 Tipos de poblaciones irradiadas

Las poblaciones de C. intermedium C 3 utilizadas en los experimentos de irradiación eran de tres tipos:

a) cultivo standard

5.2.1

Suspensión en Ringer 1/4 de un asa del crecimiento de 24 h a 30°C en agar-M 1 inclinado sembrado en estría. La concentración celular está comprendida entre 10^4 y 10^5 células/ml.

b) Colonias A y C

En ambos casos se trata de poblaciones monoclonales. Se obtienen por suspensión de una colonia A o C de C. intermedium C 3 en 150 ó 300 ml de Ringer 1/4, que da una concentración celular de 10^4 a 10^5 células/ml - por enumeración viable. Las colonias A y C se obtienen en la forma habitual, bajo la cual se lleva a cabo el análisis colonial de las poblaciones de C 3 (2.1.2.1)

c) poblaciones seleccionadas con OA

Se han utilizado dos tipos distintos: las llamadas S sg+ y S sg-. Las primeras se obtuvieron por dilución, en 300 ml de Ringer 1/4, de 0,1 ml de un cultivo de 18 h en M 1 con OA, en el cual el equilibrio $sg- \rightleftharpoons sg+$ se hallaba fuertemente desplazado sobre sg+ (Vid. 4.7.2).

El segundo tipo de población, S sg-, era monoclonal, obtenido por suspensión de una colonia cualquiera o una colonia C sobre agar-M 1 después de 20-24 h de incubación a 30°C, incluyendo además el tiempo de revelado cuando éste se llevaba a cabo. Estas colonias procedían de

la extensión de 0,1 ml de un cultivo de 12 h a 30°C en 5.2.1 M 1 con 0A en el cual el equilibrio $sg^- \rightleftharpoons sg^+$ se ha desplazado sobre los elementos sg^- , (Vid. 5.2.2).

En ambos casos la concentración final era de 10^4 a 10^5 células/ml.

5.2.2 Selección de poblaciones con anaranjado de acridina.

Para obtener las poblaciones ricas en sg^+ se ha utilizado el efecto paradójico del 0A (4.5 y 4.7.2.1) La marcha seguida se esquematiza en la Figura 5.2.2a.

Para obtener poblaciones ricas en elementos sg^- se ha utilizado el método de selección con el 0A, como se indica en 4.7.2.2. La marcha operativa seguida se esquematiza en la Figura 5.2.2b.

5.2.3 Técnica de irradiación

Se ha utilizado como fuente de rUV una lámpara germicida de baja presión Philips de 15 w (57415

P/40 M8). Estas lámparas emiten el 80-90 % de la radiación en la longitud de onda de 2500-2600 Å. Se han utilizado lámparas nuevas y en ningún caso su uso se ha prolongado hasta donde era posible esperar algún cambio de intensidad. 5.2.3

La distancia lámpara-placa era de 50 cm. En este caso, la dosis es proporcional al tiempo de exposición sobre la base de $5 \text{ erg/mm}^2/\text{seg}$. La lámpara debe mantenerse encendida durante una hora antes de iniciar la irradiación para asegurar la constancia de la intensidad, (CLOWES y HAYES, 1968).

La lámpara UV está instalada en una vitrina totalmente estanca de acero inoxidable y vidrio fabricada ex profeso (Fotografía 5.2.3).

Las muestras para irradiar están constituidas por 7 ml de suspensión en Ringer 1/4. Cada muestra se pone en una cápsula de Petri abierta, colocada perpendicularmente debajo de la lámpara a la distancia señalada. Durante la irradiación se agita cuidadosamente con una varilla de vidrio acodada. (Por ello, sólo deben utilizarse placas de vidrio con el fondo perfectamente plano; en las placas de plástico no se consigue una agitación uniforme).

5.2.3. Vitrina estéril portátil para irradiación



FOTOGRAFIA 5.2.3 Vitrina estéril portátil dotada de un tubo germicida para irradiación ultravioleta y dos tubos fluorescentes.

5.2.4 Curvas de supervivencia a tiempos crecientes de irradiación

Se llevan a cabo determinando el número viable de bacterias a tiempos sucesivos de irradiación, sembrando en placas de agar-M 1. Se toman 0,1 ml de la muestra irradiada y 0,1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . Las placas se guardan en el incubador tapadas con lámina de aluminio, para evitar fotorreactivación posterior. A los consiguientes resultados se les denomina supervivencia directa.

5.2.5 Fotorreactivación y reactivación negra

La fotorreactivación se realiza en la misma vitrina e inmediatamente después de la rUV. Se utilizan dos tubos fluorescentes Philips de 15 w de 40 cm, que emiten radiaciones principalmente entre las longitudes de onda de 4500-6000 Å, dentro del espectro visible. Las placas con las muestras se mantienen abiertas sin agitación a 50 cm de los tubos fluorescentes, durante un tiempo variable según las experiencias. Pasado este tiempo, se llevan a cabo enumeraciones viables del mismo modo que las de la curva supervivencia-tiempo de irradiación (5.2.4). Todas las operaciones se realizan en la oscuridad o semioscuridad.

La reactivación negra se efectúa guardan- 5.2.5
dando las placas de las muestras irradiadas tapadas en
la oscuridad a la temperatura ambiente o en la nevera. -
En estas condiciones de reposo divisional debido al mante
nimiento en Ringer 1/4 se puede efectuar la denominada
"Liquid Holding Recovery". Después de un tiempo varia-
ble según las experiencias, se realizan las enumeraciones
viabiles como en el caso anterior.

5.3 EFFECTO DEL FACTOR S SOBRE LA SUSCEPTIBI- LIDAD A LA RADIACION ULTRAVIOLETA

5.3.1 Respuesta de las colonias A y C

En el Cuadro 5.3.1 se consignan los resul-
tados obtenidos en cinco experimentos de irradiación de po-
blaciones monoclonales de C. intermedium C 3.

Los valores de N_0 y N corresponden al -
promedio de bacterias viabiles por placa antes y después de
irradiar. El número de placas utilizado para hallar estos
promedios oscila entre dos y seis. Los valores de N su-
periores a 1000 b/pl se estiman contando las colonias en -

CUADRO 5.3.1

ACCION LETAL DE LA IRRADIACION ULTRAVIOLETA
 SOBRE POBLACIONES DE COLONIAS A Y C DE
C. INTERMEDIUM C 3

Exp Nº	Población	Tiempo rUV (seg)	N _o	N	Superv. (%)
1	Colonia C	5	2746	2471	89
		10	"	2137	77
		15	"	525	19,1
		20	"	260	9,4
2	Colonia C	20	200	17	8,5
		40	"	0	0
3	Colonia C	20	2300	378	16,4
		25	"	154	6,7
		30	"	96	4,1
		35	"	69	3,0
4	Colonia C	30	213	28	12,9
		35	"	6,0	2,8
		40	"	1,3	0,9
5	Colonia A	30	68	7,0	10,2
		35	"	3,3	4,8
		40	"	2,0	2,8

N_o : Estima nº células/placa antes de irradiar

N : Media células/placa después de irradiar

Supervivencia directa : $S_D = \frac{N}{N_o} \cdot 100$

varias áreas de 1 cm^2 y multiplicando el promedio por la superficie de la placa; para las placas de 10 cm de diámetro se ha tomado el valor medio de $50,25 \text{ cm}^2$. 5.3.1

Los valores encontrados sugieren una mayor supervivencia para la población derivada de la colonia A. Sin embargo, a través de los datos consignados en el Cuadro 5.3.1 se observa que la diferencia no es significativa.

5.3.2 Sensibilidad y frecuencia de los elementos sg^+ en la población.

En el Cuadro 5.3.2 se señalan los resultados correspondientes a seis experimentos de irradiación sobre poblaciones seleccionadas con 0A de C. intermedium C 3, con varias y determinadas frecuencias de colonias A.

Los valores de N_0 y N indican el promedio de células viables por placa antes y después de irradiar. Para obtener este promedio se han utilizado entre tres y seis placas, cada vez.

Es aparente el incremento de la resistencia a la rUV en función del porcentaje de colonias A correspondiente al análisis colonial de la población. En la Figura 5.3.2 se aprecia el cambio sucesivo de pendiente en

CUADRO 5.3.2

ACCION LETAL DE LA IRRADIACION ULTRAVIOLETA
 SOBRE POBLACIONES DE C. INTERMEDIUM C 3
 SELECCIONADA CON 0A

Exp Nº	Poblaciones	Tiempo rUV (seg)	N ₀	N	Superv. (%)
6	S sg- (5,1% A)	20	700	7,6	1,08
		30	"	5,0	0,71
		40	"	2,3	0,32
7	S sg- (19,5% A)	20	6400	368	5,7
		30	"	226	3,5
		40	"	55	0,8
8	S sg- (27,2% A)	20	2314	329	14
		30	"	95	4,1
		40	"	28	1,2
9	S sg+ (79% A)	25	3000	480	16
		30	"	300	10
		35	"	60	2,0
10	S sg+ (83% A)	20	1550	389	25
		30	"	133	8,5
		40	"	23	1,4
11	S sg+ (92% A)	20	1250	562	46
		30	"	316	26
		40	"	75	6,0

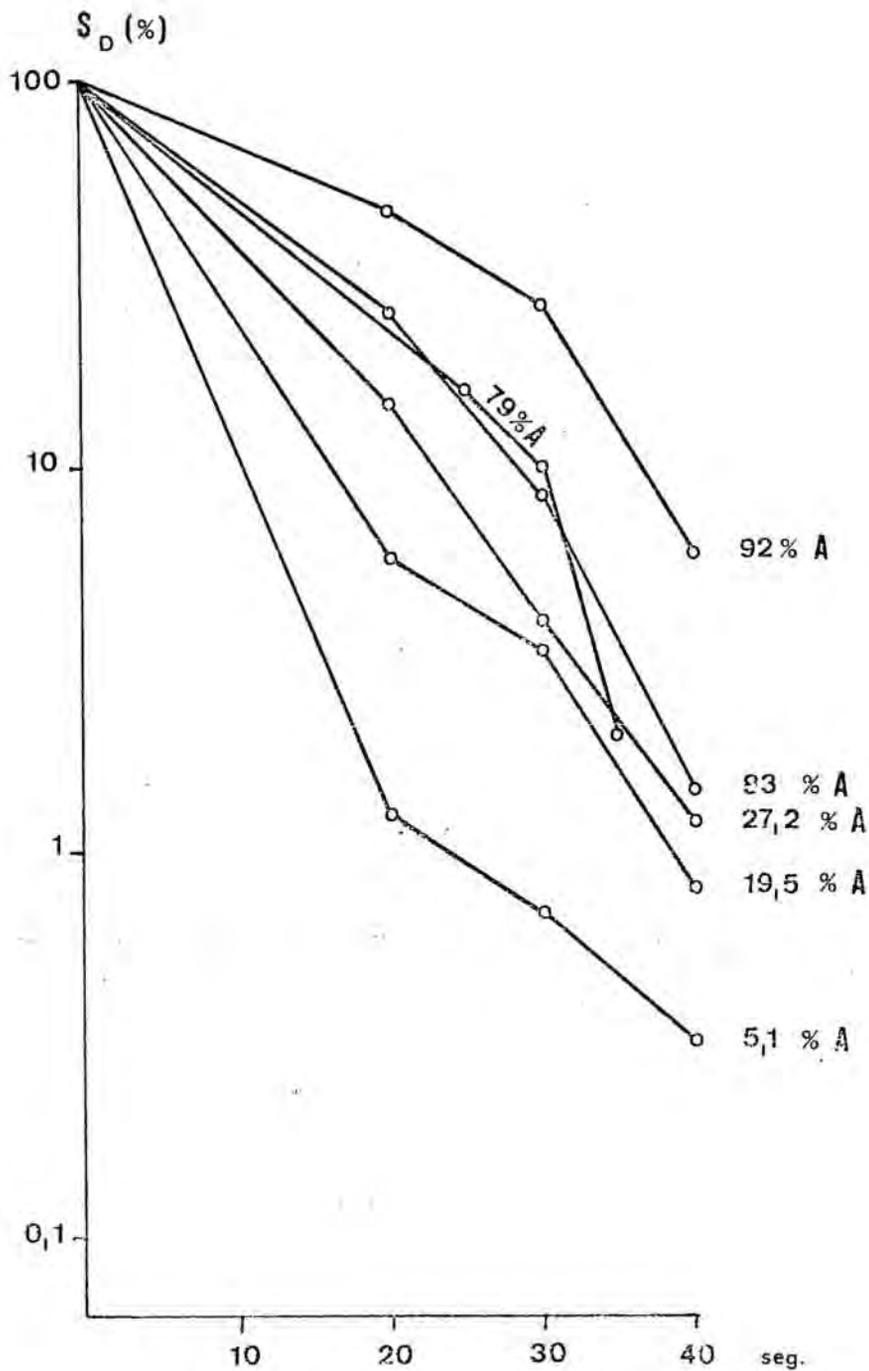


FIGURA 5.3.2 Curvas de supervivencia a la rUV de poblaciones de C. intermedium C 3 con distinta frecuencia de elementos sg⁺. (Porcentaje = frecuencia de colonias A)

función del tanto por ciento de A, así como los tipos de desviación de la respuesta logarítmica para los valores extremos. Para las poblaciones más ricas en elementos sg^+ crece el coeficiente angular con la dosis, en tanto que disminuye para las poblaciones muy ricas en elementos sg^- . 5.3.2

5.4. FOTORREACTIVACION

El fenómeno de la fotorreactivación se aprecia claramente en las Fotografías 5.4a, ..., f, donde aparecen los resultados de la rUV de una población S sg^+ (75% A), durante 20 y 30 seg. Después de la irradiación, las poblaciones de las placas de las Fotografías 5.4a y 5.4d fueron reactivadas con luz blanca durante 45 min.

5.4.1 Colonias A y C

En el Cuadro 5.4.1 se señala la repercusión luminosa del efecto letal de la irradiación de colonias A y C. Si se comparan los valores de supervivencia con los del Cuadro 5.3.1 puede observarse con facilidad que son claramente significativos y dependientes del tiempo de



FR
817 colonias

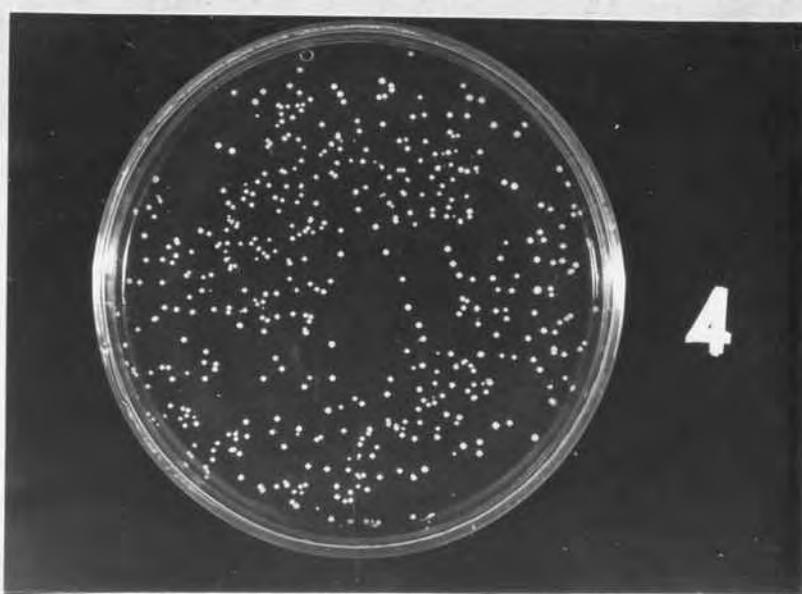


RN
608 colonias

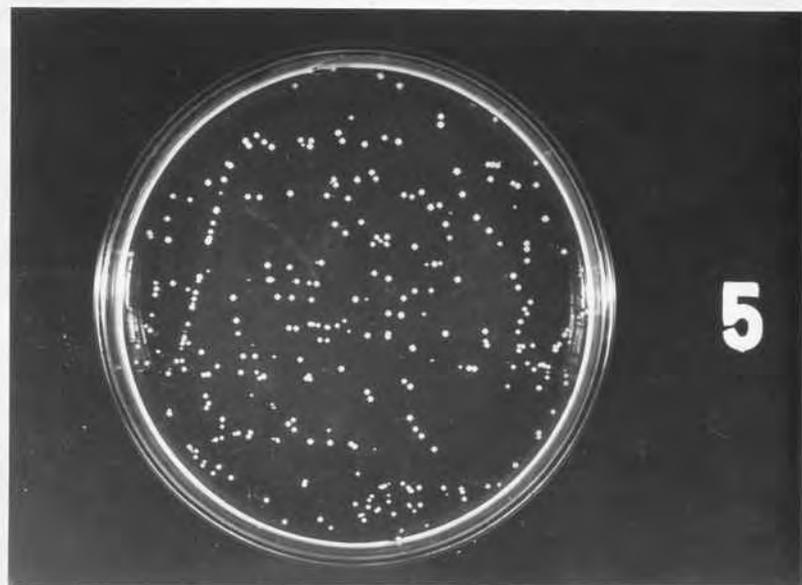


D
354 colonias

FOTOGRAFÍAS 5, 4a, b y c Crecimiento en agar-M 1 de una misma población irradiada con UV (20 seg) después de fotorreactivación, reactivación negra y siembra directa.



FR
480 colonias



RN
312 colonias



D
285 colonias

FOTOGRAFIAS 5.4d, e y f Crecimiento en agar-M 1 de una misma población irradiada con UV (30 seg) después de fotorreactivación, reactivación negra y siembra directa.

CUADRO 5.4.1

SUPERVIVENCIA DESPUES DE FOTORREACTIVACION DE
POBLACIONES IRRADIADAS DE COLONIAS A Y C DE
C. INTERMEDIUM C 3

Exp Nº	Población	Tiempo rUV (seg)	Tiempo FR (min)	N _o	N	Superv (%)
1	Colonia C	5	20	2746	2520	91
		10	"	"	2668	97
		15	"	"	1026	37
		20	"	"	844	31
2	Colonia C	20	1	200	20	10
		40	"	"	0	0
3	Colonia C	20	30	2300	195	8,4
		25	"	"	140	6,0
		30	"	"	82	3,5
		35	"	"	59	2,5
4	Colonia C	30	30	213,	85	40
		35	"	"	10,0	4,6
		40	"	"	4,0	2,1
5	Colonia A	30	30	68	19,6	28,6
		35	"	"	4,0	5,8
		40	"	"	2,3	3,4

N_o : Estima nº células/placa antes de irradiar

N : Media células/placa después de irradiar y fotorreactivar

Supervivencia después de fotorreactivación : $S_{FR} = \frac{N}{N_o} \cdot 100$

recuperación con luz. Por otra parte, no se presenta di- 5.4.1
ferencia significativa entre los resultados obtenidos con la
población de la colonia A y los correspondientes a las co-
lonias C.

5.4.2 Poblaciones con distinta proporción de elementos sg+

En el Cuadro 5.4.2 se consignan los resul-
tados obtenidos después de 45 min de recuperación lumino-
sa de las poblaciones irradiadas, seleccionadas previamente
con 0A. Los incrementos de supervivencia son mucho más
significativos que los correspondientes al Cuadro 5.3.2, -
principalmente debido al mayor tiempo de exposición a la luz
visible.

En la Figura 5.4.2 se representan las cur-
vas de supervivencia/dosis después de fotorreactivación, -
las cuales son ampliamente comparables con las de la Figu-
ra 5.3.2, correspondientes al efecto directo de la rUV. La
pendiente de todas ellas ha disminuido como consecuencia de
la recuperación.

Sin embargo, la comparación de las dos grá-
ficas muestra que la fotorreactivación es dependiente de la
proporción de elementos sg+ en la población, puesto que el
aumento relativo de supervivencia es mucho mayor para -
las poblaciones que corresponden a los valores más bajos

CUADRO 5.4.2

SUPERVIVENCIA DESPUES DE 45 min DE FOTORREACTIVACION DE POBLACIONES IRRADIADAS DE C. INTER-MEDIUM C 3 SELECCIONADAS CON 0A

Exp Nº	Población	Tiempo rUV (seg)	N ₀	N	Superv (%)
6	S sg- (5,1% A)	20	700	125	17,8
		30	"	26	3,6
		40	"	4	0,75
7	S sg- (19,5% A)	20	6400	1200	18,7
		30	"	438	6,8
		40	"	76	1,2
8	S sg- (27,2% A)	20	2314	810	35
		30	"	193	9,1
		40	"	83	3,6
9	S sg+ (79% A)	25	3000	960	32
		30	"	570	19
		35	"	360	12
10	S sg+ (83% A)	20	1550	600	38
		30	"	387	25
		40	"	139	9,0
11	S sg+ (92% A)	20	1250	825	66
		30	"	423	36
		40	"	142	11

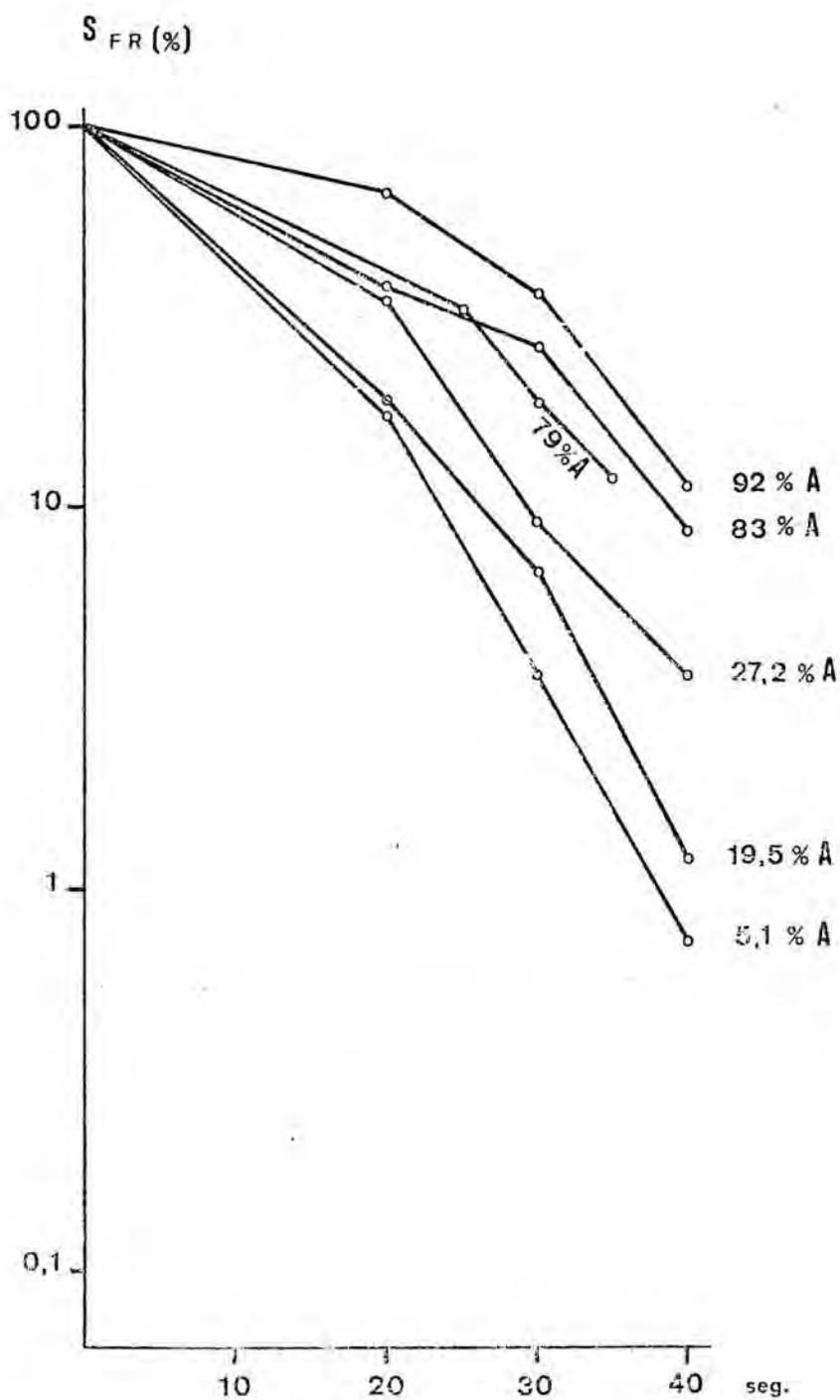


FIGURA 5.4.2 Curvas de supervivencia a la rUV después de fotoactivación para poblaciones con distinto porcentaje de elementos sgt⁺. (Porcentaje = frecuencia de colonias A)

de las frecuencias de A dados por el análisis colonial. 5.4.2

Esto es, la fotorreactivación ha tenido lugar principalmente sobre las poblaciones con una concentración plasmídica mínima, donde el efecto directo de la irradiación había sido mayor.

Por otra parte, llama la atención el hecho de que las formas de las curvas de supervivencia correspondientes a las poblaciones de bajos valores de A hayan dejado de ser bifásicas. Aparentemente, las curvas de supervivencia en la fotorreactivación corresponden todas a una misma cinética.

5.5 REACTIVACION NEGRA

En este apartado se consigna el resultado de unos experimentos en los que se determina la viabilidad de la suspensión celular en Ringer 1/4 irradiada con UV después de un tiempo de permanencia en el mismo medio y en la oscuridad, donde no tiene lugar crecimiento alguno. En este caso, como fenómeno general, ha sido observado un aumento de viabilidad con respecto a la que se obtiene cuando se extiende en placas la suspensión inmediatamente después de la irradiación. Este fenómeno se denomina también "Liquid Holding Recovery" (GANESAN y SMITH, 1958). Para dosis de UV suficientemen-

te grande, puede producirse una mortalidad adicional tal 5.5
vez por efecto de los peróxidos acumulados en la solu-
ción soporte. Este último efecto se reduce considerable-
mente si durante el tiempo de mantenimiento en líquido se
deja la suspensión bacteriana a 40 C en el refrigerador.

5.5.1 Colonias A y C

En el Cuadro 5.5.1 se indican los valores de supervivencia obtenidos en las experiencias de irradiación números 3, 4 y 5. (Cfr. Cuadro 5.3.1).

El tiempo de recuperación en reposo divisional fue de 3 h para el experimento nº 3 y de 2 h para los experimentos nº 4 y 5. Se obtuvieron supervivencias aparentemente inferiores a las correspondientes al efecto directo de la rUV. Los valores referentes a la colonia A son ligeramente mayores, pero la diferencia no es significativa.

5.5.2 Poblaciones con distinta proporción de elementos sqt

En el Cuadro 5.5.2a se señalan las super-

CUADRO 5.5.1

SUPERVIVENCIA DESPUES DE REACTIVACION NEGRA
DE POBLACIONES IRRADIADAS DE COLONIAS A Y C DE
C. INTERMEDIUM C 3

Exp Nº	Población	Tiempo rUV (seg)	Tiempo RN (horas)	N _o	N	Superv (%)
3	Colonia C	20	3	2300	46	2,0
		25	"	"	26	1,1
		30	"	"	11	0,47
		35	"	"	5,0	0,21
4	Colonia C	30	2	213	9	4,2
		35	"	"	4	1,8
		40	"	"	1	0,46
5	Colonia A	30	2	68	2,3	3,4
		35	"	"	2,6	3,8
		40	"	"	1,8	1,3

N_o : Estima N^o células/placa antes de irradiar

N : Media células/placa después de irradiación y reactivación
negra.

Supervivencia después de reactivación negra: $S_{RN} = \frac{N}{N_o} \cdot 100$

CUADRO 5.5.2a

SUPERVIVENCIA DESPUES DE 2 h DE REACTIVACION
 NEGRA DE POBLACIONES IRRADIADAS DE C. INTER-
MEDIUM C 3 SELECCIONADAS CON 0A

Exp nº	Población	Tiempo rUV (seg)	N _o	N	Superv. (%)
6	S sg- (5,1% A)	20	700	17	2,4
		30	"	10,3	1,5
		40	"	3,0	0,42
7	S sg- (19,5% A)	20	6400	337	5,2
		30	"	164	2,5
		40	"	44	0,67
8	S sg- (27,2% A)	20	2314	18	8,0
		30	"	7,6	3,3
		40	"	2,3	1,0
9	S sg+ (79% A)	25	3000	285	9,5
		30	"	162	5,4
		35	"	39	1,3
10	S sg+ (83% A)	20	1550	245	16
		30	"	77	4,9
		40	"	32	2,1
11	S sg+ (92% A)	20	1250	408	33
		30	"	270	22
		40	"	90	7,3

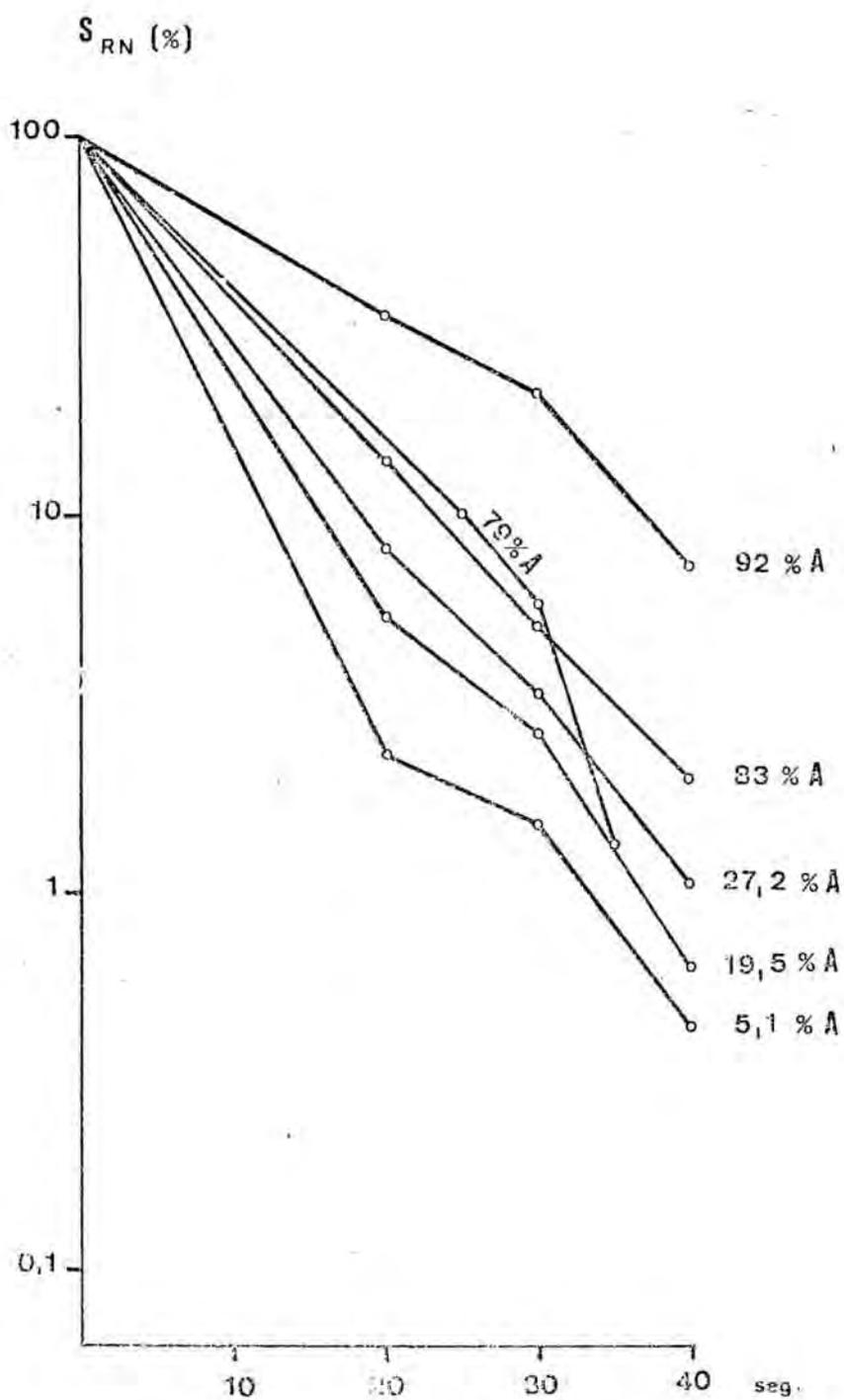


FIGURA 5.5.2a Curvas de supervivencia a la rUV después de reactivación negra para poblaciones con distinto porcentaje de elementos sg+. (Porcentaje = frecuencia de colonias A)

vivencias de 2 h de reactivación en la oscuridad sin multiplicación celular. Estas supervivencias corresponden a tres dosis distintas de irradiación, para poblaciones en las que la frecuencia de elementos sg+ era sucesivamente mayor, de acuerdo con las frecuencias de colonias A determinadas por análisis colonial. Las poblaciones correspondientes a los experimentos nº 6, 7 y 8, fueron obtenidas por selección con 0A en favor de los elementos no segregadores (4.7.2), mientras que los de los experimentos nº 9, 10 y 11 resultaron de la selección con 0A en favor de los elementos sg+ (5.2.1). El conjunto de ellas permite obtener unas muestras distribuidas con bastante uniformidad entre las poblaciones teóricas de 0 y 100 % sg+.

En la Figura 5.5.2a se representan las curvas de supervivencia después de reactivación negra correspondientes a las distintas poblaciones. La distribución de las mismas es análoga a la obtenida por efecto directo. La forma de las curvas correspondientes a los valores extremos de los porcentajes de colonias A son también del mismo tipo, a diferencia de lo que ocurre con las curvas después de fotorreactivación.

En el Cuadro 5.5.2b se consignan los resultados de cinco experimentos de irradiación en los que se comparaba la recuperación directa con la fotorreactivación y la reactivación negra; esta última después de 2 h a la temperatura ambiente o en el refrigerador, a 4º C, y después de 3,5 h a la misma baja temperatura.

CUADRO 5.5.2b

SUPERVIVENCIA ABSOLUTA DE UNA POBLACION SELECCIONADA DE C. INTERMEDIUM C 3 (75 % A) DESPUES DE SIEMBRA DIRECTA, FOTORREACTIVACION Y REACTIVACION NEGRA.

Tiempo irrad. (seg)	Tratamiento ulterior a la irradiación.	Nº absoluto células/ml.
10	Siembra directa	1915
20	" "	1040
30	" "	430
40	" "	92
10	Fotorreact. (45 min. temp. ambiente)	2378
20	" "	2965
30	" "	2357
40	" "	2310
10	React. Negra (2 h; temp. ambiente)	1263
20	" "	1393
30	" "	831
40	" "	336
10	React. Negra (2 h; en la nevera)	3850
20	" "	3827
30	" "	1658
40	" "	429
10	React. Negra (3,5 h; en la nevera)	2663
20	" "	2185
30	" "	1876
40	" "	1423

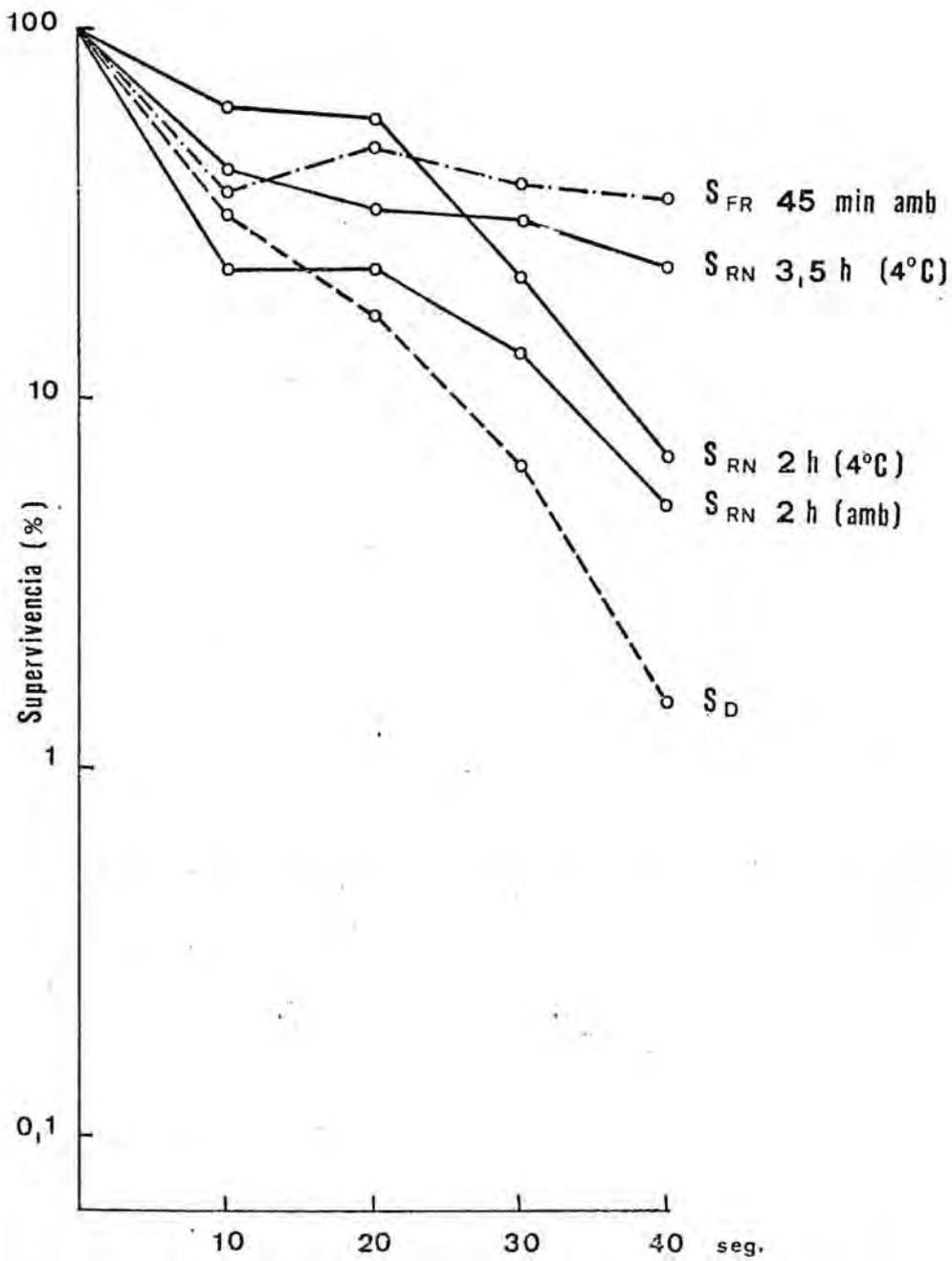


FIGURA 5.5.2b Supervivencias después de foto-reactivación, reactivación negra y siembra directa de una población irradiada de C. intermedium C 3 seleccionada con 0A (75% A).

En la Figura 5.5.2b se pone de manifiesto la acción letal adicional a temperatura ambiente -debida tal vez a la presencia de peróxidos- y el hecho de que la recuperación negra después de 3,5 h a 40 C está cerca de la recuperación máxima representada por la foto-rreactivación -conseguida en este experimento.

La población utilizada era una S sg+, que por análisis colonial dio un promedio de 75 % de colonias A. Los datos numéricos para construir las curvas de la Figura 5.5.2b para las respectivas supervivencias - S_D , S_{FR} y S_{RN} se calcularon haciendo

$$S(x) = \frac{N}{N_0} \cdot 100$$

donde N en este caso es la concentración final de células en Ringer 1/4 después de la irradiación y N_0 la concentración inicial, obtenida a partir de una enumeración viable y que resultó ser de 6000 células/ml.

5.6 ANÁLISIS COLONIAL DE LAS POBLACIONES IRRADIADAS

En los apartados anteriores de este capítulo, se estudia la influencia del factor S en la población sg

bre la supervivencia, después de una definida dosis de 5.6 rUV, bien directamente o después de recuperación lumínica o negra. Ahora se consignan los resultados obtenidos en los análisis coloniales de las poblaciones después de la irradiación, en vista de conocer el posible cambio de la distribución de dicho factor en la población. En el primer caso, se trata de determinar la influencia del plásmido sobre el efecto de la rUV en el ADN cromosómico, mientras que en el segundo es la acción de la irradiación sobre el propio plásmido.

5.6.1 Efecto directo de la irradiación ultravioleta sobre la frecuencia de colonias A

En algunos casos se practicaron análisis coloniales paralelamente a las determinaciones viables. En otros, los porcentajes de colonias A se refieren a análisis coloniales realizados en experimentos emparejados, en los cuales no se tuvo en cuenta la supervivencia. Ello es debido a que el tipo de dilución necesario para una y otra determinación no es el mismo, y algunas pruebas resultan adecuadas sólo para una de ellas.

En el Cuadro 5.6.1a se consignan los resultados obtenidos para varias colonias A y C. Ellos muestran que no hay diferencias importantes en la composición

CUADRO 5.6.1a

EFFECTO DIRECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA SO
BRE LAS FRECUENCIAS DE COLONIAS A EN POBLACIO-
NES DE COLONIAS A Y C DE C. INTERMEDIUM C 3

Exp nº	Población	TIEMPO DE IRRADIACION UV							
		0 SEG		20 SEG		30 SEG		35 SEG	
		A/T	%	A/T	%	A/T	%	A/T	%
2	Col C	-		20/51	40	-		-	
3	Col C	-		-		33/85	40	-	
4	Col C	-		-		-		9/18	50
5	Col A	-		-		2/3	-	-	
i	Col C (30%A)	36/118	30	-		36/74		-	
ii	Col A (44%A)	53/119	44	-		57/102	57	-	

CUADRO 5.6.1b

EFFECTO DIRECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA SO
BRE LAS FRECUENCIAS DE COLONIAS A EN POBLACIO-
NES SELECCIONADAS DE C. INTERMEDIUM C 3

Exp nº	Población	TIEMPO DE IRRADIACION UV							
		0 SEG		20 SEG		30 SEG		40 SEG	
		A/T	%	A/T	%	A/T	%	A/T	%
6	S sg-(5,1)	6/117	5	1/23	4	2/20	10	0/7	-
7	S sg-(19,5)	25/128	19	21/67	31	16/59	27	1/12	-
9	S sg+(79)	78/99	79	57/62	92	68/99	68	39/113	34
10	S sg+(83)	85/102	83	29/30	97	10/10	100	38/45	84
11	S sg+(92)	119/129	92	89/94	88	71/86	83	13/14	93

A/T = Nº colonias A/Nº total colonias

Frec. A (%)

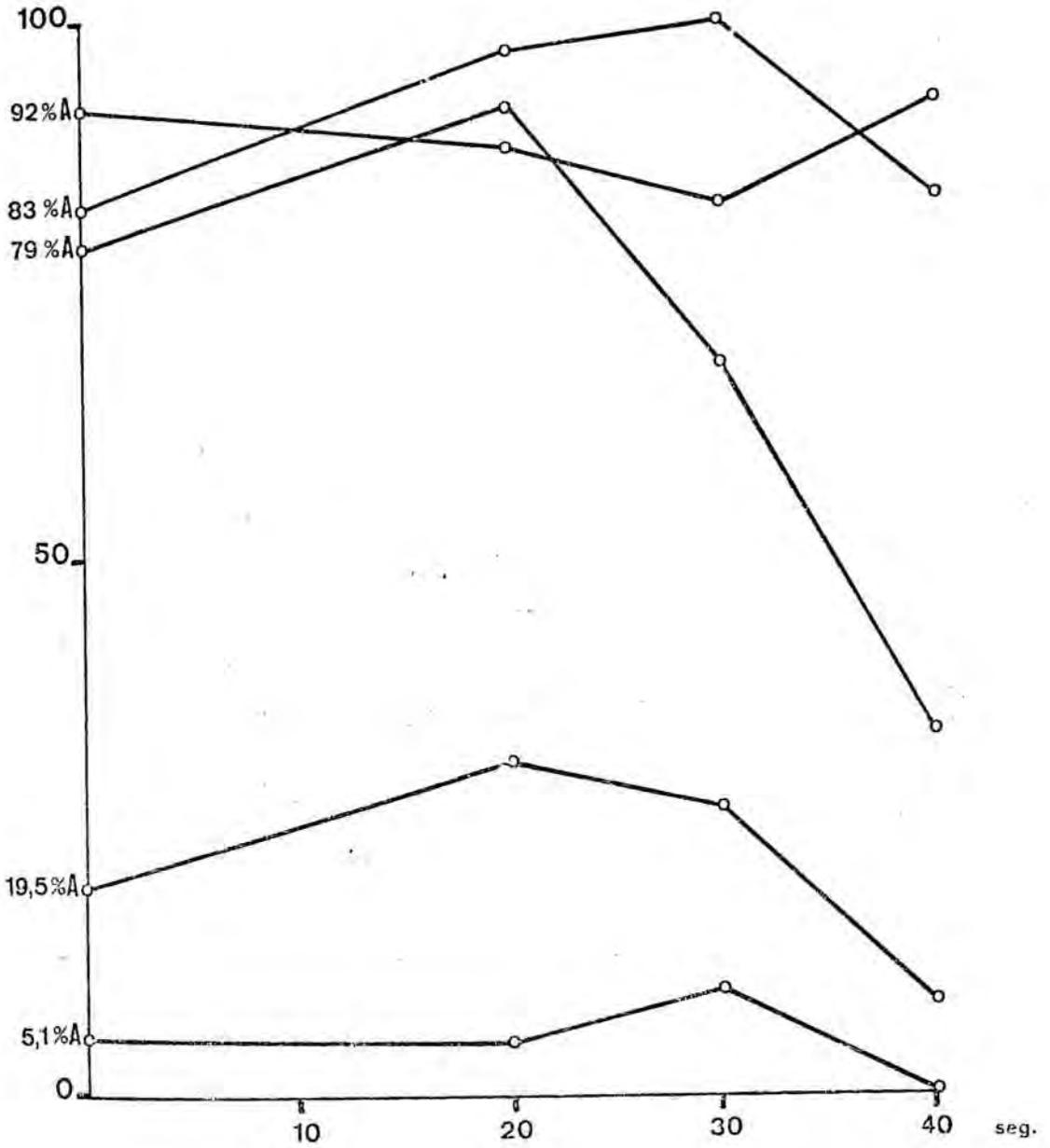


FIGURA 5.6.1 Variación de la frecuencia de elementos sg^+ en función de la dosis de rUV en poblaciones seleccionadas con 0A con distintos porcentajes iniciales de colonias A.

de la población después de distintas dosis de rUV. El 5.6.1
ligero incremento de colonias A no puede considerarse
significativo en ninguno de los casos.

En el Cuadro 5.6.1b se refieren los resultados del análisis colonial correspondiente a los experimentos de irradiación con poblaciones seleccionadas. Se representan gráficamente en la Figura 5.6.1, en la que puede observarse una tendencia a disminuir los porcentajes de A para las dosis elevadas como consecuencia de la irradiación de poblaciones de partida con porcentajes intermedios. En realidad, no existe una base experimental suficiente para poder asegurar este tipo de comportamiento, y los resultados expresados no excluyen la posibilidad de que la frecuencia inicial de colonias A permanezca sustancialmente inalterada en todos los casos.

5.6.2 Frecuencia de colonias A después de fotorreactivación

En el Cuadro 5.6.2a se indican las frecuencias relativas a poblaciones de colonias A y C, y en el Cuadro 5.6.2b las correspondientes a poblaciones seleccionadas con 0A. En el primer caso el tiempo de fotorreactivación es de 30 min y en el segundo de 45 min.

Los resultados del Cuadro 5.6.2b ponen de manifiesto que después de fotorreactivación la población

CUADRO 5.6.2a

FRECUENCIA DE COLONIAS A DESPUES DE FOTORREACTIVACION EN POBLACIONES DE COLONIAS A Y C - DE C. INTERMEDIUM C 3

Exp nº	Población	Tiempo FR (min)	TIEMPO DE IRRADIACION UV					
			20 SEG		30 SEG		40 SEG	
			A/T	%	A/T	%	A/T	%
4	Col C	30	-	-	12/30	40		
5	Col A	"	-	32/59	54	-		
i	Col C (30%)	"	-	-	22/54	41		
ii	Col A (44%)	"	-	-	14/36	36		

CUADRO 5.6.2b

FRECUENCIA DE COLONIAS A DESPUES DE FOTORREACTIVACION EN POBLACIONES DE C. INTERMEDIUM C 3 SELECCIONADAS CON 0A

Exp nº	población	Tiempo FR (min)	TIEMPO DE IRRADIACION UV					
			20 SEG		30 SEG		40 SEG	
			A/T	%	A/T	%	A/T	%
6	S sg-(5,1)	45	0/8	-	10/77	13	1/16	6
7	S sg-(19,5)	"	-	-	21/38	55	4/19	21
9	S sg+(79)	"	-	-	94/158	59	64/100	64
10	S sg+(83)	"	11/15	73	83/94	88	27/31	87
11	S sg+(92)	"	53/58	91	30/36	83	37/41	90

sometida a rUV presenta un porcentaje de sg+ equivalente al de partida. Este resultado puede ser distinto del relativo al efecto directo, especialmente para las poblaciones de partida de niveles intermedios. 5.6.2

5.6.3 Frecuencia de colonias A después de reactivación negra

En los Cuadros 5.6.3a y b se registran los resultados obtenidos en los análisis coloniales verificados sobre distintos tipos de poblaciones después de un tiempo de reactivación en la oscuridad. Para las poblaciones seleccionadas con 0A este tiempo es de 2 h.

El efecto encontrado se asemeja en algunos aspectos al de la acción directa de la irradiación. Sobre todo, se considera significativo el no haber encontrado ninguna colonia A entre 9 y 13 colonias a la dosis correspondiente a los 40 seg de exposición. Podría sugerirse que después de 2 h de reactivación negra los porcentajes de colonias A también tienden a ser más bajos que los de partida. Este resultado puede estar ligado a un periodo insuficiente de reactivación en la oscuridad, después del cual podría encontrarse un efecto coincidente con el de la fotorreactivación.

CUADRO 5.6.3a

FRECUENCIA DE COLONIAS A DESPUES DE REACTIVACION NEGRA EN POBLACIONES DE COLONIAS A Y C DE C. INTERMEDIUM C 3

Exp nº	Población	Tiempo RN (horas)	TIEMPO DE IRRADIACION UV					
			20 SEG		25 SEG		35 SEG	
			A/T	%	A/T	%	A/T	%
3	Col C	3	19/46	41	20/52	38	-	
4	Col C	2	-		-		5/12	41
5	Col A	2	-		-		0/2	-
i	Col C (30%A)	1	-		37/74	50	-	
ii	Col A (44%A)	1	-		58/98	59	-	

CUADRO 5.6.3b

FRECUENCIA DE COLONIAS A DESPUES DE REACTIVACION NEGRA EN POBLACIONES DE C. INTERMEDIUM C 3 SELECCIONADAS CON 0A

Exp nº	Población	Tiempo RN (horas)	TIEMPO DE IRRADIACION UV					
			20 SEG		30 SEG		40 SEG	
			A/T	%	A/T	%	A/T	%
6	S sg-(5,1)	2	4/50	8	3/31	10	0/9	-
7	S sg-(19)	"	8/41	19	10/51	19	0/13	-
9	S sg+(79)	"	50/81	61	-		79/102	77
10	S sg+(83)	"	10/10	100	31/33	93	12/12	100
11	S sg+(92)	"	112/120	93	55/62	88	16/17	94

5.6.4 Identificación de las colonias C resultantes de la irradiación ultravioleta.

El examen microscópico de las colonias C correspondientes a los análisis coloniales de los experimentos anteriores mostraron una limpieza completa del campo circundante. Este tipo de colonias C se presentaba aparentemente con una frecuencia mayor que en los análisis coloniales de poblaciones normales sin irradiar. Esta observación planteó la conveniencia de examinar la población de estas colonias C a través de un nuevo análisis colonial que permitiera su comparación con las colonias C habituales. En el cuadro 5.6.4 se señalan los porcentajes de A correspondientes a varias de las referidas colonias C. Ellos muestran que no puede establecerse ninguna distinción con las colonias C normales.

CUADRO 5.6.4

ANÁLISIS COLONIAL DE COLONIAS C DE POBLACIONES
IRRADIADAS DE C. INTERMEDIUM C 3

Col C nº	Población	Procedencia			Total	Análisis colonial			
		rUV	Tratamiento			A	B	C	Frec A
1	79 % A	25 seg	RN	2 h	24	7	9	8	29%
2	79 % A	35 seg.	DIR	0 h	37	28	4	5	76%
3	27,2% A	40 seg	DIR	0 h	16	6	4	6	37%
4	92 % A	20 seg	FR	45 min	27	19	8	0	70%
5	19,5% A	30 seg	RN	2 h	28	12	7	9	43%
6	5,1% A	30 seg	FR	45 min	33	15	10	8	45%

5.7 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Puede considerarse que en cada célula bacteriana existen \underline{n} enlaces o grupos químicos susceptibles de ser alterados por efecto de la rUV. Las lesiones que se produzcan como consecuencia de una definida dosis de irradiación, \underline{D} , dependen de esta dosis y de \underline{n} .

Si una lesión química como las señaladas, es suficiente para inactivar la célula bacteriana, la supervivencia, \underline{S} , de una población irradiada vendrá dada por la distribución de Poisson:

$$S = e^{-kDn}$$

siendo \underline{k} la probabilidad de interacción de la radiación con un determinado grupo químico por célula. Por otra parte

$$D = I t$$

y por lo tanto

$$S = e^{-kIt n}$$

o también

$$\log S = -k' t n \quad (1)$$

siendo constante la intensidad de la fuente de UV (DAVIS et al., 1967).

La ecuación (1) permite definir para cada tipo bacteriano un blanco con el valor de $\underline{k'n}$, que es la

pendiente de la recta teórica de supervivencia en coordenadas semilogarítmicas y en función del tiempo de irradiación. 5.7

Una curva de supervivencia con un tamaño de blanco mayor quiere significar que el número total de blancos letales por célula ha aumentado. En general, el tamaño del blanco es proporcional al tamaño del genoma bacteriano (BRESLER et al., 1964 y 1967).

Se han encontrado bacterias que por mutación varían su sensibilidad a la rUV. Desde el punto de vista cinético la mutante sensible presenta un tamaño de blanco mayor. Sin embargo, este resultado se interpreta como consecuencia de la mutación de un locus que afecta la capacidad de restauración del ADN cromosómico. (KAHN, 1969).

Hasta ahora, todas las poblaciones estudiadas de C. intermedium C 3 están constituidas por individuos segregadores y no segregadores de aminoácidos. - Unas y otras pueden sufrir interconversión. Según se ha mostrado anteriormente (4,5), hay fundadas razones para admitir que en los individuos sg- existen múltiples - elementos iguales de tipo episómico, autónomos en el citoplasma, en tanto que en los sg+ se encuentra solamente uno de éstos, integrado en el cromosoma bacteriano - (4.6).

También se ha establecido (4,6) que la pro-

babilidad de integración del material episómico depende del 5.7
número de elementos libres presentes en el citoplasma, y
por lo tanto de la velocidad relativa de multiplicación de -
éstos con respecto a la del cromosoma.

EIOA disminuye la velocidad de multiplica-
ción de los elementos autónomos, y como consecuencia el
número de células con episoma integrado en la población
también se hace menor (PRITCHARD, 1969). De este
modo, el número de individuos sg^+ en equilibrio es propor-
cional a la concentración promedio de elementos episómi-
cos en la población, en poblaciones en las cuales haya una
cantidad suficiente de individuos sg^- . Finalmente, una me-
dida de la concentración de individuos sg^+ viene dada por
la fracción de colonias A, resultante del análisis colonial -
de la población.

Después de lo señalado, se puede tomar el
porcentaje de A correspondiente a una definida población,
tanto como medida relativa de la frecuencia de elementos
 sg^+ como de la concentración promedio del ADN extracro-
mosómico.

Las curvas de supervivencia representadas
en la Figura 5.3.2 corresponden a poblaciones idénticas -
con relación al ADN cromosómico, pero con concentracio-
nes crecientes de ADN episómico. De acuerdo con ellas,
el tamaño del blanco disminuye en relación inversa a la -
concentración de ADN extracromosómico.

Es muy difícil obtener, hasta el presente, 5.7 una población de C. intermedium C 3 desprovista totalmente del factor S, lo cual ha hecho suponer que es casi imprescindible para la viabilidad en M 1. Ningún otro tipo de material plasmídico ha revelado una propiedad semejante, aunque no es imposible que puedan presentarla en algunos medios de crecimiento determinados. Sin embargo, es verosímil suponer que este hecho revele una diferencia esencial entre la naturaleza del factor S y la de los otros materiales de tipo episómico conocidos.

Con posterioridad a los experimentos descritos en la presente memoria, y dentro de la misma línea de trabajo del Departamento, VALOIX (1970) ha conseguido con 0A poblaciones no segregadoras, que, al parecer, no pueden volver a la población de partida por cultivos sucesivos. Esta población, sin embargo, difiere morfológica y fisiológicamente de la cepa standard de C. intermedium C 3 y ha perdido la capacidad de crecer anaeróbicamente en M 1.

La familia de curvas representada en la Figura 5.3.2 sugiere que el tamaño mayor del blanco correspondería a la población sin factor S. De otro modo, que la mínima capacidad de restauración del ADN cromosómico estaría en este tipo de población, mientras que aumenta a medida que se hace mayor la concentración episómica.

La influencia de la concentración del factor S en la restauración de las lesiones químicas producidas

por la rUV queda también particularmente sugerida a tra- 5.7
vés de la comparación de las referidas curvas de supervi-
vencia (Figura 5.3.2) con la Figura 5.7a procedente de
SMITH y HANAWALT (1969; p. 134). En esta última
se representan las curvas de supervivencia para E. coli
B obtenidas por ROBERTS y ALDOUS (1949), cuando
después de la irradiación eran mantenidas, en reposo divi-
sional y en la oscuridad, durante tiempos crecientes antes
de la determinación del número de células viables. Resul-
ta aparente la semejanza entre los dos grupos de curvas.
En un caso tenemos el efecto de tiempos crecientes de re-
cuperación negra y en el otro de cantidades crecientes de
material episómico.

El número de lesiones bioquímicas origina-
das por irradiación de una mutante sensible es el mismo
que en la forma salvaje. Por lo tanto, la diferencia debe
residir en la incapacidad total o parcial de la primera pa-
ra restaurar las estructuras originales. El mecanismo de
restauración por mantenimiento en reposo divisional y en -
la oscuridad ha sido considerablemente aclarado después -
de los trabajos de GANESAN y SMITH (1968), HANA-
WALT (1968), HOWARD-FLANDERS (1968) y SETLOW
(1968). La reactivación negra del ADN resulta de la se-
paración de los dímeros por un enzima hidrolítico y la eli-
minación del segmento correspondiente. Dicho segmento es
reconstituido por un polimerasa que copia sobre el segmen-
to complementario. Este tipo de restauración del ADN de-
pende de que sea de doble cadena y, además, de la exis-
tencia y concentración suficiente de los dos enzimas referi-

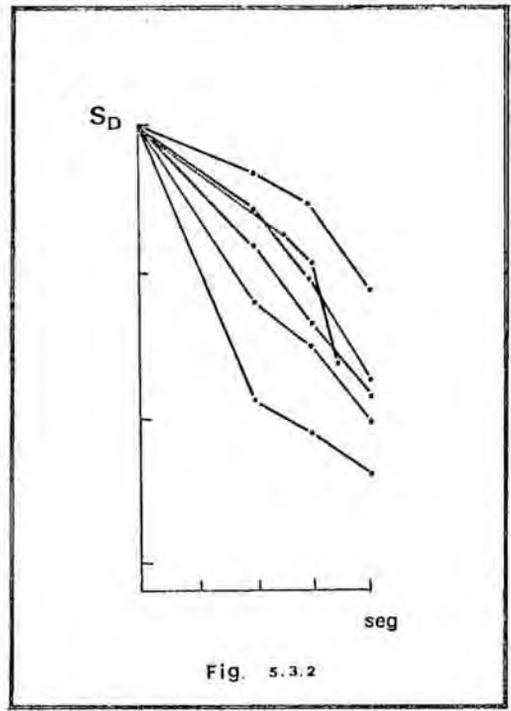
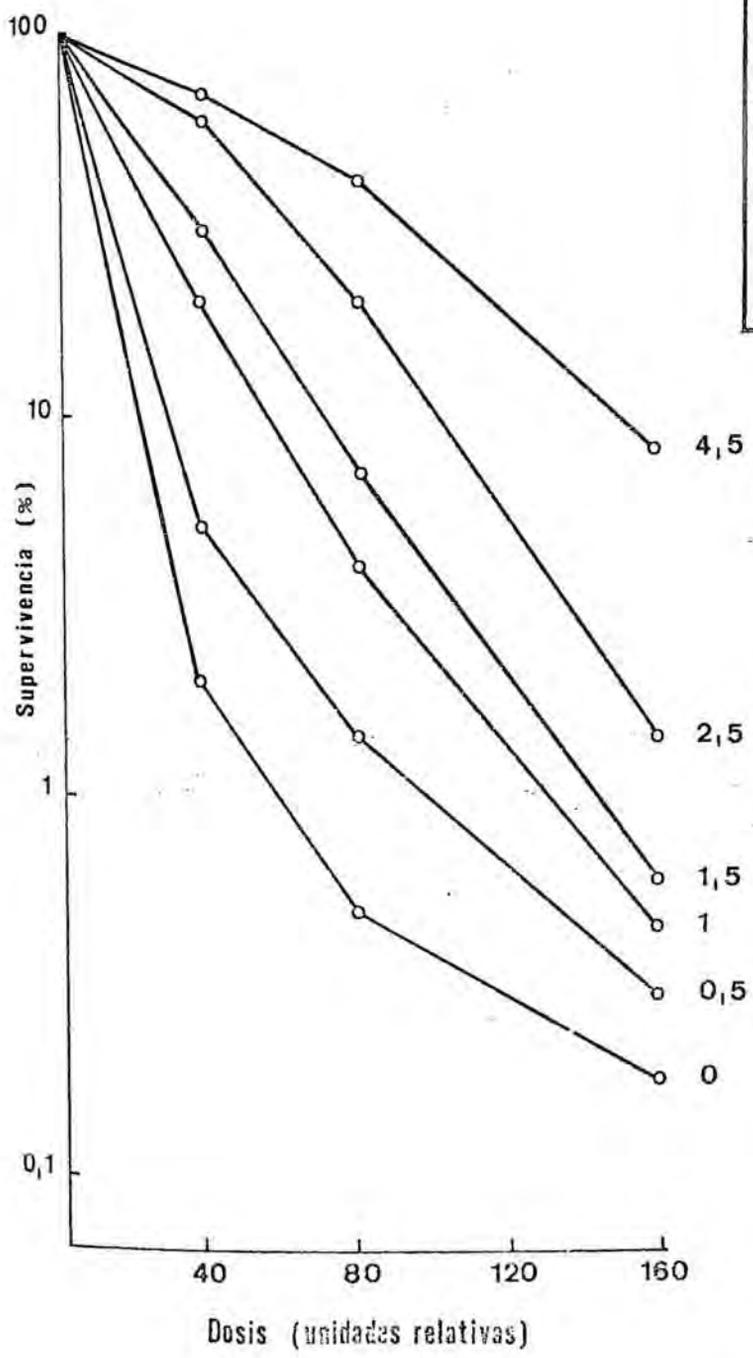


FIGURA 5.7.a Supervivencia de E. coli B después de diferentes tiempos de reactivación negra. (Según Roberts y Aldous, 1.949).

dos. Las mutantes sensibles a la rUV carecen de estos 5.7
últimos o tienen una concentración mucho más pequeña,
De este modo, el efecto de la concentración del factor S
consistiría en determinar una concentración cada vez ma-
yor de uno o ambas enzimas. La verificación directa de
este supuesto es perfectamente posible y queda planteada
para futuros trabajos.

En 1965, HOWARTH mostró que algunas
cepas de Salmonella typhimurium y Escherichia coli que
habían adquirido el factor coll eran menos sensibles a los
efectos letales de la rUV, con relación a las cepas corres-
pondientes no colicinógenas. Dicho autor utiliza como fuen-
te de rUV una lámpara de arco de alta presión de mercurio
y encuentra un efecto letal en ambas cepas bacterianas
mucho menor. No obstante, la diferencia entre las curvas
colicinógenas y no colicinógenas es del mismo orden que la
hallada para el factor S entre las poblaciones de mayor y
menor porcentaje de colonias A.

En 1968, DRABBLE y STOCKER mos-
traron que cuatro RTF fi^- y un fi^+ se asemejan al factor
coll en su propiedad de proteger a la cepa LT 2 de -
S. typhimurium de los efectos bactericidas de la rUV.
Utilizando unas condiciones experimentales muy semejantes
a las seguidas en los experimentos descritos en el presen-
te capítulo, encuentran unas curvas de supervivencia, para
las cepas desprovistas de factores R, superponibles a la
curva de supervivencia de la población de C. intermedium
C 3 con 5,1 % de colonias A. Las curvas de superviven

cia de las cepas con factores R presentan una pendiente 5,7 menor que la correspondiente a la de C. Intermedium C 3 con 92 % de colonias A. La resistencia conferida por el factor R en estos casos es aproximadamente doble de la correspondiente al factor S.

Recientemente, MARSH y SMITH (1969) encuentran un aumento de supervivencia en E. coli K 12 por efecto de factores R. Los valores de protección son inferiores a los encontrados para el factor S referidos a las poblaciones con 92 % de A. Por último, SICCARDI (1969) ha encontrado, entre 31 plásmidos ensayados en E. coli K 12, 15 que tienen acción protectora, 11 con poco o ningún efecto, y 5 que incrementan la sensibilidad a la rUV. Dentro de los plásmidos ensayados había 17 factores R, 3 col y 11 R-col.

Los factores R se hallan únicamente en estado autónomo, al igual que algunos factores col. Sin embargo, se conocen ejemplos de estos últimos, como coll, que pueden estar simultánea o alternativamente en estado integrado (DAVIS et al., 1967). En los experimentos anteriores no es posible conocer una diferencia de efecto protector entre uno y otro estado del plásmido. En el efecto global del factor S considerado hasta aquí tampoco puede establecerse ninguna distinción a este respecto, pero parece más coherente considerar los efectos observados como consecuencia del factor S en su estado autónomo y múltiple. En este caso, su acción es comparable a la apreciada en los otros tipos de plásmido referidos.

En la Figura 5.7b se representan los valores de la supervivencia para cada dosis en función del porcentaje de colonias A de la población de C. intermedium C 3 ensayada. Estas curvas muestran que la protección crece más rápidamente para las poblaciones con altos porcentajes de colonias A, en las cuales no sólo aumenta la concentración de material plasmídico sino que hay muchas más células que lo poseen en forma integrada. 5.7

Esto hace suponer que la acción protectora del plásmido integrado es mayor que en su estado libre. De otro modo, que la protección por efecto trans es posible, si bien se potencia en estado cis. Esto vendría a indicar que además de la concentración enzimática antes sugerida, en el mecanismo de protección local sobre el ADN plasmídico existen genes reguladores del tipo de los operadores.

El efecto cis señalado en el párrafo anterior es probablemente responsable del cambio de pendiente de las curvas de supervivencia de la Figura 5.3.2, correspondientes a las poblaciones con 5 y 92 % de colonias A. En el primer caso, se tendría una curva bifásica, con elementos con distinto valor de k' . En el segundo, una curva de supervivencia del tipo de impacto múltiple ("multiple hit"). El aumento de n en esta última indica las veces que se potencia la acción protectora por efecto cis.

El mecanismo celular de recuperación me-

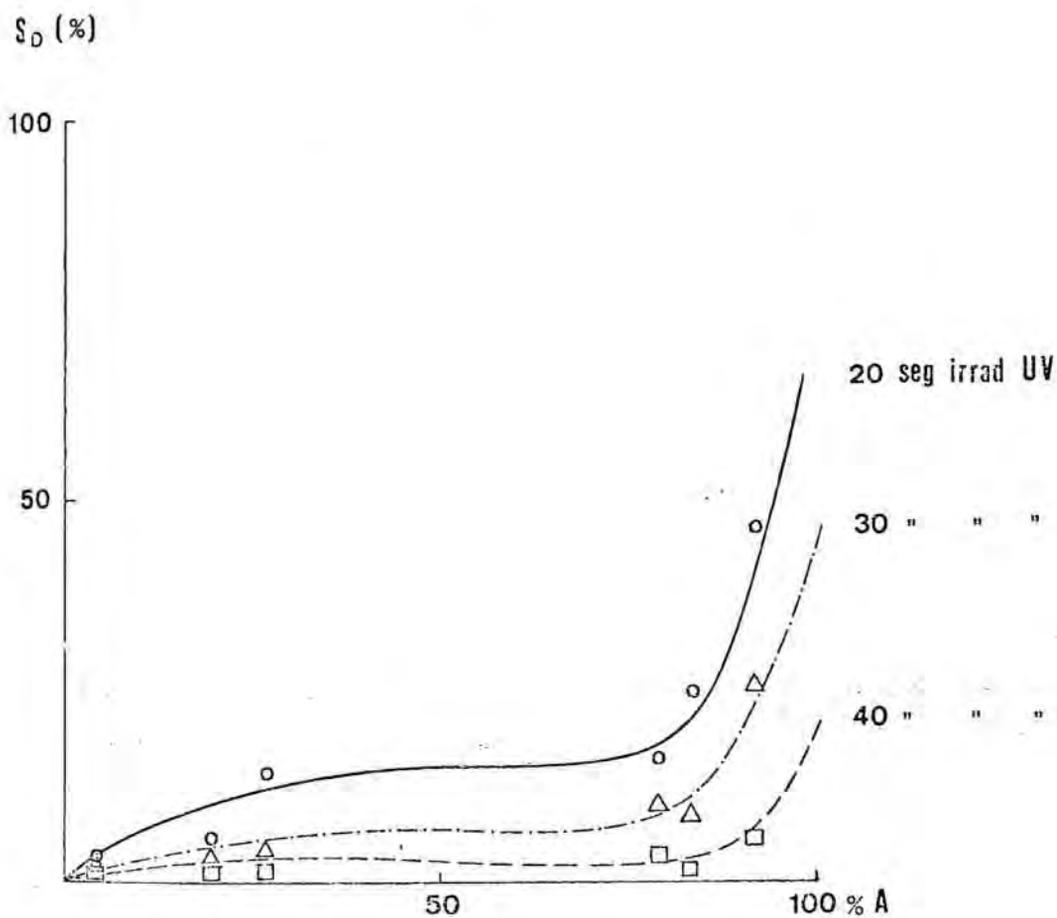


FIGURA 5.7b Valores de la supervivencia para cada dosis de rUV en función del porcentaje de colonias A de la población de C. intermedium C 3.

5.7
jor caracterizado hasta el presente es aquél en el que la luz visible facilita la restauración "in situ" de las lesiones producidas por la rUV en el ADN. La disociación de los dímeros de la pirimidina ha sido mostrada "in vitro" por efecto de fotorreactivación enzimática, no sólo sobre ADN transformable irradiado sino también sobre dímeros de la timina (SMITH y HANAWALT, 1969).

En el Cuadro 5.7c se consignan los valores de la fotorreactivación en tantos por ciento, obtenidos después de distintas dosis de rUV en poblaciones con porcentajes de colonias A de 5 a 92 %. La representación gráfica de los mismos, Figura 5.7c, muestra que la fotorreactivación aumenta rápidamente para las poblaciones con porcentajes de colonias A más bajos, lo cual debe ser consecuencia de la falta de eficacia de los mecanismos de restauración episómica en estas poblaciones. Para las dosis de rUV menores, la fotorreactivación disminuye para altos valores de los porcentajes de A, por la misma razón. En cambio es oscuro el significado del incremento de la fotorreactivación para las dosis altas, lo cual puede tener una doble explicación:

a) ser consecuencia de la población con episoma integrado, en la cual el enzima que controla la disociación fotoquímica se halle potenciado por el episoma integrado;

b) ser causado por la destrucción fotoquímica

FOTORREACTIVACION DE POBLACIONES IRRADIADAS DE C. INTERMEDIUM C 3
SELECCIONADAS CON 0A

Exp nº	Población	TIEMPO DE IRRADIACION ULTRAVIOLETA												
		20 SEGUNDOS		30 SEGUNDOS		40 SEGUNDOS		30 SEGUNDOS		40 SEGUNDOS		40 SEGUNDOS		
	% S _D	%S _{FR}	FR	%S _D	%S _{FR}	FR	%S _D	%S _{FR}	FR	%S _D	%S _{FR}	FR	%S _D	FR
6	S sg- 5,1% A	1,08	17,8	17	0,71	3,6	4,07	0,32	0,75	1,34				
7	S sg- 19,5% A	5,7	18,7	2,3	3,5	6,8	0,94	0,8	1,2	0,50				
8	S sg- 27,2% A	14,2	35	1,5	4,1	9,1	1,27	1,2	3,6	2,0				
9	S sg+ 79% A	16	32,4	1,02	10	19	0,90	2	12	5				
10	S sg+ 83% A	25	38,7	0,56	7,3	25	2,4	1,4	6,1	3,35				
11	S sg+ 92% A	45,6	66	0,44	25,6	36	0,40	6,0	11,3	0,88				

$$\text{FOTORREACTIVACION : FR} = \frac{S_{FR} - S_D}{S_D}$$

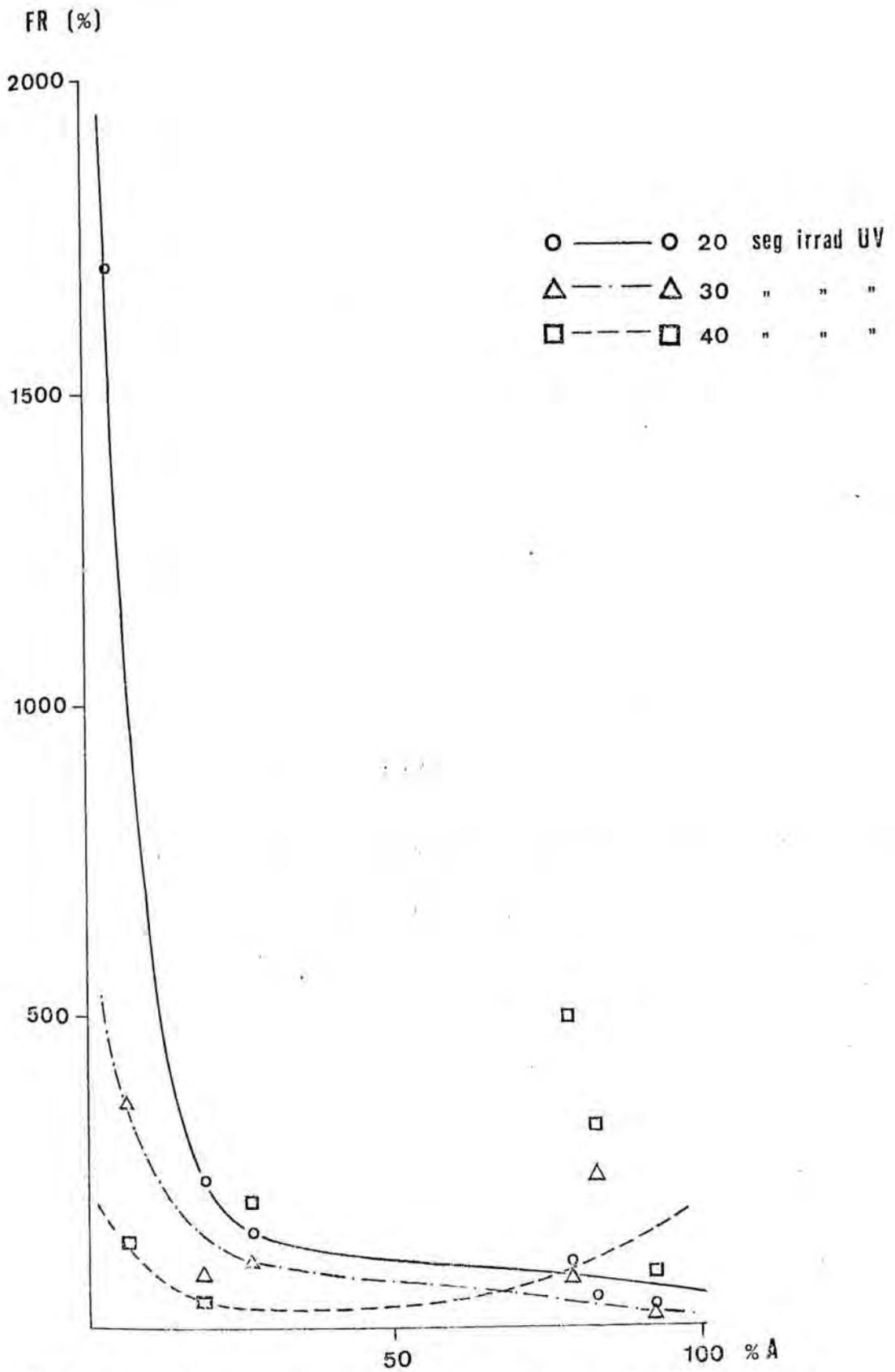


FIGURA 5.7c Fotorreactivación después de rUV de poblaciones de C. intermedium C 3 con distinta frecuencia de colonias A.

de productos tóxicos originados por la rUV y que para dosis elevadas tienen importancia en el efecto letal. 5.7

En los experimentos consignados en el Cuadro 5.7d se compara la diferencia de efectividad de la reactivación negra según el tiempo y la temperatura a la que se haya llevado a cabo (Vid. Cuadro 5.5.2b). En la Figura 5.7d se pone de manifiesto la correspondiente diferencia entre la cinética de las curvas de reactivación negra y lumínica.

En el Cuadro 5.7e se registran los valores de la reactivación negra para cada dosis y tipo de población seleccionada, según los datos del Cuadro 5.5.2a. Anteriormente ya se ha señalado el posible significado de los valores negativos. El hecho de encontrar aquí incrementos de recuperación para las dosis más pequeñas, parece abogar en favor de la diferencia de restauración entre los individuos con episomas integrado y episoma autónomo.

El efecto de letalidad adicional, independientemente de cuál sea su causa, puede obviarse manteniendo la suspensión celular a baja temperatura durante el tiempo de recuperación en líquido. En los experimentos citados en el Cuadro 5.7e esta precaución no se consideró necesaria ya que en esas experiencias no se perseguía determinar un efecto absoluto de la reactivación negra, sino tan sólo su dependencia de la proporción de colonias A de las poblaciones - muestra. Naturalmente, se hace referencia a los valores encontrados en las poblaciones seleccionadas y no a los de

CUADRO 5.7d

FOTORREACTIVACION Y REACTIVACION NEGRA DE UNA
POBLACION SELECCIONADA DE C. INTERMEDIUM C 3
(75 % A)

Tratamiento siguiente a la irradiac.	TIEMPO DE IRRADIACION UV							
	10 SEG		20 SEG		30 SEG		40 SEG	
	Superv	React	Superv	React	Superv	React	Superv	React
FR (45 min temp amb)	2378	0,24	2965	1,85	2357	4,48	2310	25,1.
RN (3,5 h, a 40 C)	2663	0,39	2185	1,10	1876	3,36	1423	14,4
RN (2 h, a 40 C)	3850	1,01	3827	1,71	1658	2,85	429	3,66
RN 2 h, temp amb)	1263	-0,33	1393	0,34	831	0,90	336	2,60

Supervivencia : (S_{FR} y S_{RN}) según Cuadro 5.5.2b

Reactivación : $FR = \frac{S_{FR} - S_D}{S_D}$ y $RN = \frac{S_{RN} - S_D}{S_D}$

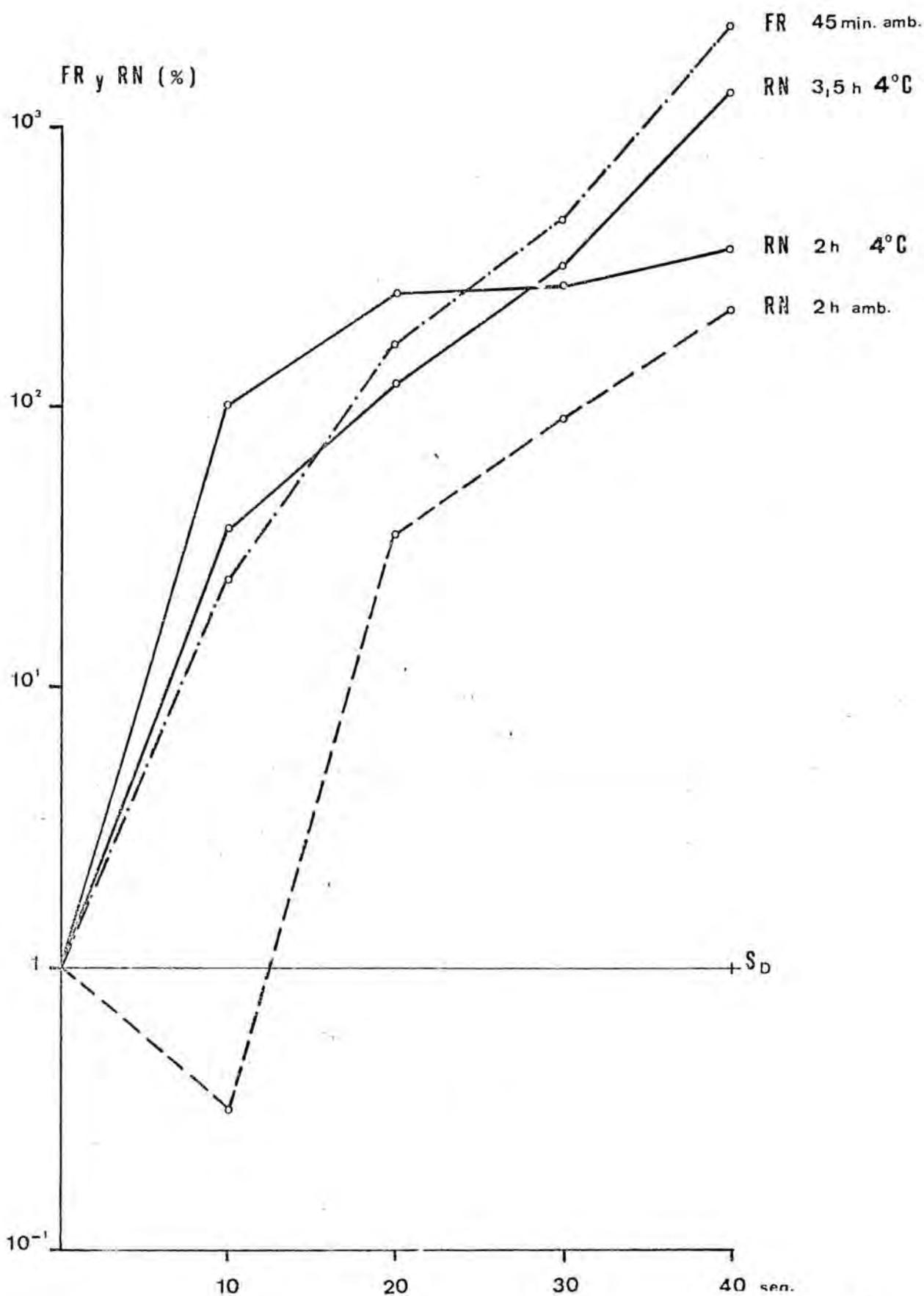


FIGURA 5.7d Fotorreactivación y reactivación negra de una población irradiada de C. intermedium C 3 seleccionada con 0A (75% A).

REACTIVACION NEGRA DE POBLACIONES IRRADIADAS DE C. INTERMEDIUM C 3
SELECCIONADAS CON 0A

TIEMPO DE IRRADIACION ULTRAVIOLETA

Exp nº	Población	20 SEGUNDOS		30 SEGUNDOS		40 SEGUNDOS			
		% S _D	RN	% S _D	RN	% S _D	RN		
6	S sg- 5,1% A	1,08	2,4	1,2	1,47	1,07	0,32	0,42	0,31
7	S sg- 19,5% A	5,7	5,2	-0,10	2,5	-0,28	0,8	0,6	-0,25
8	S sg- 27,2% A	14,2	8	-0,44	4,1	-0,17	1,2	1,0	-0,16
9	S sg+ 79% A	16	9,5	-0,40	10	-0,46	2	1,3	-0,35
10	S sg+ 83% A	25	15,8	-0,36	7,3	-0,31	1,4	2,0	0,42
11	S sg+ 92% A	45,6	32,6	-0,28	25,6	-0,15	6,0	7,2	0,2

REACTIVACION NEGRA : $RN = \frac{S_{RN} - S_D}{S_D}$

las poblaciones en equilibrio natural -colonias A y C-, don 5.7 de no se ha podido detectar un aumento de viabilidad, y - donde este aumento debe ser muy pequeño atendiendo a la proporción de elementos sg^+ y sg^- de las mismas, que es próximo al 50 %.

Los experimentos de inactivación por rUV y restauración posterior han constituido una interesante aportación para el conocimiento del significado del factor S en - C. intermedium C 3, y, además representan una prueba totalmente independiente de la heterogeneidad de las poblaciones, lo cual, hasta ahora, sólo había estado condicionado a la propiedad de segregar aminoácidos. El efecto germicida de la rUV es función de un pretratamiento con OA.

La heterogeneidad de las poblaciones de C. intermedium C 3 señalada es coherente con la presencia de - un factor episómico que se comporta de forma parecida a algunos factores R y col, y que por lo tanto, siguiendo a SICCARDI (1969), puede clasificarse de UVP+.

El estudio de las curvas de supervivencia y de la fotorreactivación y reactivación negra está de acuerdo con el supuesto de que en las poblaciones que dan altos - porcentajes de colonias A existe una fracción proporcional de células en las cuales el plásmido se halla bajo forma integrada.

El efecto protector del factor S sobre la acción germicida de la rUV se debe a su intervención en la

restauración del ADN. De acuerdo con los resultados encontrados, cabe entonces esperar que además de su acción sobre la regulación del ciclo del ácido cítrico tiene otra sobre la síntesis de un enzima hidrolítico y de un polimerasa que actúan disolviendo y reconstruyendo respectivamente el fragmento de ADN dañado. Se sugiere también un efecto sobre el enzima que cataliza la disociación fotoquímica de los dímeros de la timina. Ambos efectos son susceptibles de una verificación directa ulterior. 5.7

Al parecer, la rUV disminuye ligeramente el porcentaje de colonias A de las poblaciones de C. intermedium C 3. Esta acción es poco significativa hasta donde ha sido mostrado, pero de confirmarse sería una consecuencia natural del efecto directo de la rUV sobre el ADN extracromosómico. Es sugestivo el hecho de que desaparezca esta acción por fotorreactivación y reactivación negra, lo cual confirmaría dicho supuesto.

La multiplicidad del factor S en su estado autónomo sería responsable de la debilidad de este efecto de la rUV. En realidad, ello constituye una confirmación indirecta de la multiplicidad, porque de lo contrario tendría que encontrarse una acción mayor. De acuerdo con eso, después de reactivación negra no aparecen colonias A cuando las poblaciones irradiadas tienen una baja concentración episómica, de conformidad con un bajo porcentaje de colonias A.

6 RESUMEN

Citrobacter intermedium C 3 es una enterobacteriácea aislada en 1961 por CLOTET, después de la búsqueda deliberada de bacterias del agua y del suelo capaces de desarrollarse con amoníaco como única fuente de nitrógeno y dotadas de la propiedad de acumular aminoácidos en el medio después del crecimiento (CLOTET y PARES, 1962).

Es un coliforme típicamente del grupo intermedio, capaz de producir fermentación ácida-mixta de la glucosa y de utilizar citrato como única fuente de carbono. Fermenta rápidamente la lactosa a 30° C y habitualmente no produce SH₂, pero oscurece ligeramente la picadura en el me-

dio de Kligler. Se distingue de otras cepas de colección de C. intermedium por utilizar la sacarosa produciendo ácido y gas, por ser Eijkman negativo y por segregar al medio extracelular una cantidad importante de aminoácidos.

Los aminoácidos acumulados en el medio son alanina, glutamato, aspartato y aminoácidos básicos, el primero en mayor proporción que los demás. En la presente memoria se estudia solamente la individualidad y condicionamiento genético de la segregación de glutamato. Previamente se ha demostrado la identidad colonial de la segregación de alanina y glutamato por el método de los calcos (HERNANDEZ, 1938).

El fenómeno de la producción microbiana de aminoácidos se había mirado como una propiedad común a todos los individuos de la cepa segregadora (KINOSHITA, 1963). No obstante, se sabía que algunas de estas cepas podían variar notablemente su rendimiento, a partir de un mismo sustrato, y que cultivos procedentes de una misma cepa original podían aumentar o disminuir su capacidad de producción; en todos los casos estos hechos se habían interpretado bajo el supuesto de una población homogénea, y las variaciones cuantitativas consecuencia de la utilización simultánea de varias vías metabólicas.

Los experimentos de análisis colonial practicados en C. intermedium C 3, utilizando una cepa auxotrófica para el glutamato, Leuconostoc mesenteroides P 60 mostraron desde los primeros ensayos que la población de

C. intermedium C 3 no era homogénea, distinguiéndose tres tipos de colonias: colonias A, con abundante crecimiento de la cepa auxotrófica, colonias B, con un ligero halo de crecimiento, y colonias C, sin crecimiento apreciable a simple vista. Las colonias más frecuentes eran las de tipo A y C, por lo que podía descartarse la posibilidad de un fenómeno cuantitativo aleatorio, según el cual, las más abundantes habrían sido las de tipo intermedio. La frecuencia de las colonias A era de un 60 % con respecto al total de colonias observadas (GUINEA, 1966). Se llegó a la conclusión de que la citada heterogeneidad colonial era consecuencia de un equilibrio estable en la población entre dos formas coexistentes, segregadoras y no segregadoras, con una elevada probabilidad de interconversión, $sg^+ \rightleftharpoons sg^-$ (GUINEA, 1966; HERNANDEZ, 1968).

La heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 con respecto a la acumulación de glutamato ha mostrado una posibilidad totalmente nueva dentro de la problemática de la producción bacteriana de aminoácidos. La existencia de un equilibrio entre células segregadoras y no segregadoras, permite considerar que el aumento o disminución de la cantidad de aminoácidos acumulados en el medio depende tanto de la velocidad relativa de intercambio de ambos tipos celulares, como de la cantidad específica de aminoácidos segregada por célula. La prueba de la fluctuación pone de manifiesto que el cambio $sg^- \rightarrow sg^+$ tiene carácter aleatorio, con una probabilidad por célula y generación del orden del 1 % (GUINEA, 1966; HERNANDEZ, 1968).

El modelo episómico, postulado a partir de los experimentos de incubación en agitación continua y con anaranjado de acridina (HERNANDEZ, 1968), ha resultado especialmente adecuado para explicar tanto la heterogeneidad - de la población, como el mantenimiento de un equilibrio entre elementos segregadores y no segregadores. Por otra parte, sugiere la posibilidad de que la segregación de aminoácidos sea consecuencia de la presencia de un episoma en otras cepas, sin que la población tenga que ser necesariamente heterogénea.

Las ideas referidas mostraron la conveniencia de examinar el fenómeno de la producción bacteriana de aminoácidos en otros organismos distintos de C. intermedium C 3. El objeto que se persigue es el de encontrar respuesta a las dos cuestiones siguientes: Si el fenómeno de segregación de aminoácidos es análogo o no al de otras bacterias productoras de aminoácidos, y si la referida propiedad exclusiva de la cepa o es común con otras cepas taxonómicamente afines.

Entre las cepas productoras descritas en la bibliografía se eligió la ATCC 13032 de Micrococcus glutamicus, que es hasta hoy el microorganismo de mayor producción específica de un aminoácido. Para comprobar si otras bacterias del grupo intermedio podían segregar aminoácidos se escogieron cinco cepas de colección, un Citrobacter intermedium, tres Citrobacter freundii y un Paracolobactrum intermedium.

El revelado de las colonias de M. glutamicus ofreció algunas dificultades a causa del lento crecimiento de esta cepa en los medios sólidos utilizados (Vid. 2.1.2.3 y Cuadro 2,1.3.2). Todas las colonias reveladas presentaban un halo denso, y por tanto debían equipararse a las colonias A de C. intermedium C 3. Pero, como se podía apreciar a simple vista, los halos de las colonias obtenidas en una misma placa no eran uniformes, lo cual se confirmaba con el examen microscópico. Con el fin de aumentar la resolución del análisis colonial, se llevaron a cabo nuevos ensayos, en los que se iniciaba el revelado cuando las colonias empezaban a ser perceptibles; de este modo fue posible obtener en una misma placa colonias con y sin halo (Vid. Fotografías 2.1 a 26).

Aunque con el método del análisis colonial establecido con L. mesenteroides P 60 no ha sido posible obtener una heterogeneidad colonial de M. glutamicus ATCC 13032, que pueda compararse a la estudiada en C. intermedium C 3, no se puede concluir que la segregación de glutamato alrededor de las colonias de M. glutamicus sea uniforme, sugiriéndose que las diferencias a este respecto pueden significar diferencias reales entre los individuos de la población en cuanto a la propiedad de segregar glutamato.

Si en el mismo cultivo se encontrasen elementos segregadores y no segregadores, como ocurre en C. intermedium C 3, con una frecuencia alta de interconversión, los resultados obtenidos serían compatibles con una heterogeneidad en la manifestación fenolípica, siquiera en el aspecto

cuantitativo. Es entonces difícil poder encontrar un modelo distinto del episómico para dar cuenta de los hechos.

Es posible sugerir, como conclusión general en relación a los experimentos realizados, que los mecanismos de segregación de aminoácidos en C. intermedium C 3 y M. glutamicus pueden ser semejantes y en ambos casos de origen episómico. La intervención de un ADN extracromosómico en un fenómeno de este tipo constituiría una explicación comprensible de como puede ser estabilizado en la población una desregulación metabólica tan importante.

La incubación y análisis colonial de las cinco cepas del grupo intermedio ensayadas se hicieron en las mismas condiciones que las habituales en C. intermedium C 3, precisándose sólo pequeñas variaciones en las condiciones experimentales. Según los resultados obtenidos (Cuadro 2.2.3) sólo C. intermedium C 3 puede considerarse como una cepa segregadora de aminoácidos. En las otras cepas no se presentan halos de crecimiento de L. mesenteroides o, si los hay, son tan pequeños que pueden ser atribuidos a autólisis; por lo demás cuando se presenta este tipo de respuesta, es uniforme para todas las colonias.

El estudio de las cepas citadas de coliformes se realizó también con intención de utilizar las que fueran adecuadas como aceptores para la transferencia episómica. En este sentido, Paracolobactrum intermedium ATCC 11606, resultó especialmente aconsejable por la limpieza de sus colonias después del revelado, y en él consiguió GUINEA por

primera vez la transferencia del factor S a un huésped distinto de C. intermedium C 3 (PARES y GUINEA, 1969a).

La diferencia entre los elementos sg⁺ y sg⁻ no puede referirse a la mutación de un gene estructural. Aparte de la alta frecuencia de conversión en sg⁻ → sg⁺, situada por HERNANDEZ (1968) de $3 \cdot 10^{-2}$ incompatible con una mutación clásica, debe tenerse en cuenta que ambos tipos celulares son capaces de formar glutamato, de acuerdo con su desarrollo en medios carentes de este aminoácido.

GUINEA (1966) demostró que la sustitución de parte de la glucosa por α -cetoglutarato en el medio de agar-M 1 (Vid. 2.1.2.3) hacía desaparecer la heterogeneidad, acumulándose glutamato alrededor de todas las colonias. Este hecho constituyó la base de la formulación de un modelo de regulación de la síntesis de glutamato en C. intermedium C 3 de acuerdo con el de represión enzimática de JACOB y MONOD (1961) (Vid. 3.1).

Según este modelo, el dimorfismo celular podría basarse en que los elementos sg⁺ tendrían inutilizado el mecanismo regulador, como consecuencia de la presencia del factor episómico, posiblemente en estado integrado (Vid.4.6).

Por tanto, la verificación experimental del modelo requería, entre otras observaciones, demostrar que la utilización de la glucosa u otro sustrato exterior no era espe-

cíficamente incrementada por un mecanismo independiente del que afecta a la síntesis de glutamato.

Se ensayó en primer lugar el efecto de la sustitución total de la glucosa por su equivalente molar de α -cetoglutarato. Aunque las condiciones de incubación a 30°C y revelado tuvieron que modificarse adecuadamente -ya que C. intermedium C 3 crece con lentitud en un medio con α -cetoglutarato como única fuente de carbono-, se puso de manifiesto que el α -cetoglutarato produce una fenocopia, determinando una homogeneidad colonial correspondiente a colonias A. Puede excluirse la posibilidad de que la uniformidad de colonias se deba a un desarrollo exclusivo de elementos sg+, ya que por el método de los calcos se demostró que todas las células de la población obtenida en M 1 pueden desarrollarse en M 1 α cetoglutarato.

Las poblaciones crecidas sobre citrato como única fuente de carbono disponible, registran unos análisis coloniales equivalentes estadísticamente a las crecidas sobre glucosa (Cuadro 3.3). Este resultado constituye una confirmación importante del modelo bioquímico propuesto para explicar la heterogeneidad colonial.

El citrato puede considerarse como inductor de un nuevo tipo de disociación colonial consistente en la presencia de colonias "gigantes", que sólo difieren de las normales en su mayor diámetro, pero constituidas en apariencia por un desarrollo vegetativo idéntico. Su diámetro alcanza fácilmente 2-3 mm en placas con un número muy elevado de colonias,

cuyo diámetro normal queda detenido por debajo de 0,5 mm. Las referidas colonias gigantes no pueden distinguirse de las normales en las primeras 30 h, pero luego siguen creciendo, en tanto que el desarrollo de las otras se detiene.

El porcentaje de colonias gigantes que pueden desarrollarse sobre M 1-citrato a partir de una colonia C es pequeño. En cambio, aumenta significativamente, 14 %, cuando se siembra en placa después de un tiempo corto (de 1,30 a 5 h) de incubación en M 1, para luego descender cuando el tiempo de incubación pasa de 12 h. La comparación de los resultados de los cuadros 3.4.2a y 3.4.2d' pone de manifiesto que la frecuencia de colonias gigantes es distinta según sea la colonia utilizada, pero que siempre está ligada al desarrollo en agar-M 1 citrato.

Estas observaciones sugirieron llevar a cabo nuevos experimentos, en los que la frecuencia de colonias gigantes fuera examinada simultáneamente partiendo de colonias A y C. Se destacó claramente que el tamaño del inóculo es un factor importante en la frecuencia absoluta de colonias gigantes. Cuando se inicia el cultivo con muy pocas células el máximo de colonias gigantes se alcanza mucho más tarde. En las diferencias encontradas en los experimentos realizados (Vid. Cuadros 3.4.3a y 3.4.3b), este factor se superpone al efecto de las diferencias iniciales existentes entre las colonias A y C. Al parecer, la disociación gigante sería consecuencia de un factor soluble producido durante el crecimiento, el cual se da exclusivamente o con mayor intensidad

en la fracción de la población más abundante en las colonias A con respecto a las C, es decir, en los elementos sg⁺.

Por otra parte, el análisis colonial de las colonias gigantes y pequeñas que se consigna en el Cuadro 3.4.3c indica que las colonias gigantes tienen una elevada proporción de células sg⁺ (92 y 90% de colonias A). Son un tipo de colonias que podrían ser denominadas super A, o colonias A gigantes, por cuanto daría un revelado necesariamente de A por el tamaño, además de darlo por la frecuencia de elementos sg⁺. En la Figura 3.4.3 se señala la evolución del número de colonias gigantes a lo largo del tiempo de incubación en M 1, que está determinada por el tamaño del inóculo y por la proporción de elementos sg⁺ en el mismo.

La utilización de medios con otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico, succinato y malato, como única fuente de carbono, mantuvo la heterogeneidad colonial, aunque de distinto tipo de la observada habitualmente en glucosa, ya que parece ser que ambos sustratos incrementan la segregación de glutamato por célula. El succinato es utilizado muy lentamente por C, Intermedium C 3, precisándose para realizar los análisis coloniales, un periodo previo de adaptación de la cepa en agar inclinado M 1-succinato. El malato es utilizado en idénticas condiciones que la glucosa, pero produce un efecto notorio que parece eliminar la heterogeneidad colonial. En realidad, experimentos con tiempos variables de incubación a 30°C demuestran que aquélla se mantiene, aunque el malato parece aumentar o bien la segregación específica de glutamato por los elementos sg⁺, o bien su velocidad de multiplicación o, incluso, ambos mecanismos (Vid. Cuadro 3.5.2.1.)

En las experiencias anteriores se observó que el número de colonias por placa en M 1-malato era sistemáticamente menor que en M 1, partiendo de las mismas diluciones y tipos de población. Se llevaron a cabo experimentos adicionales de verificación, cuyos resultados (Cuadros 3.5.2.3a b y c) indican que son significativamente distintos los números viables para los tres tipos de población standard, S sg+ y - S sg-, con respecto al crecimiento paralelo en agar-M 1 y agar-M 1 malato, aunque estas diferencias no tienen por qué estar relacionadas con el porcentaje del carácter sg+ o sg- de la población.

La utilización de xilosa, glicerina, sorbitol o piruvato como únicas fuentes de carbono en el medio M 1, tampoco modifica la heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 con respecto a la segregación de glutamato, y excluye la posibilidad de utilización selectiva de la glucosa entre las formas sg+ y sg- con independencia del ciclo del ácido cítrico.

El agar M 1-piruvato permite un mejor crecimiento de C. intermedium C 3 que el agar-M 1 para el mismo tiempo de incubación; esto sugiere que es utilizado más rápidamente que la glucosa. El piruvato aumenta también la frecuencia de colonias A (Cuadro 3.6.4a) aparentemente con un efecto análogo al malato, si bien cuantitativamente menos importante. La segregación de aminoácidos a partir de piruvato ha sido demostrada por primera vez, ya que el citado sustrato interfiere con el método de la sal de cobre para la detección de aminoácidos utilizado anteriormente.

Parece deducirse de lo expuesto que el rellenado artificial del ciclo del ácido cítrico por alguno de los intermediarios, o por el piruvato, disminuye la velocidad de circulación del ciclo, que tiende a eliminar material por alguna de las posibles salidas, como es la superproducción de aminoácidos; pero no hay indicios de que este efecto sea diferente en las formas sg^+ y sg^- . La utilización de sustratos, distintos de la glucosa, en general, constituyen una evidencia experimental considerable de que la desregulación de la síntesis del glutamato está restringida al sistema del isocitrato deshidrogenasa.

En las células sg^- , que crecen aeróbicamente, el ciclo del ácido cítrico gira de modo que su actividad suministra suficiente energía para absorber todas las posibilidades de su acción biosintética. Pero en las células sg^+ debe haber un factor endógeno que condiciona la desregulación del sistema, cuando se encuentra en un estado activo. Puesto que en un medio determinado, como el M 1, se da una permanente coexistencia de los elementos sg^+ y sg^- , ese estado activo ha de ser lo suficientemente lábil para poder explicar la estabilidad del equilibrio de la población bacteriana.

El anaranjado de acridina (OA) se ha venido utilizando, en concentraciones subletales, como un agente que eliminaba o impedía la multiplicación de los episomas en estado autónomo, no teniendo ningún efecto sobre los integrados

al cromosoma bacteriano (HIROTA, 1960). El 0A puede inhibir selectivamente la multiplicación del ADN autónomo y por tanto utilizarse para probar la localización extracromosómica de una determinada característica hereditaria, suministrando, además, una valiosa información acerca de las posibilidades de integración de un plásmido de acuerdo con la pérdida de sensibilidad al tratamiento (WATANABE, 1963).

Como ya se ha dicho, HERNANDEZ (1968) puso de manifiesto que el cambio $sg^+ \rightleftharpoons sg^-$ que tiene lugar en la descendencia de una colonia C es sensible a la agitación mecánica, y al tratamiento con 0A. Pero los experimentos realizados con el 0A representaban un caso muy particular, aunque suficiente para el objetivo propuesto. Se estudiaba en ellos el efecto del 0A en poblaciones derivadas de colonias C y sólo durante el intervalo de unas 10 generaciones a partir de poblaciones iniciales de 1 a 10 células por mililitro. Se requerían por tanto experimentos adicionales, para poder llegar a una conclusión general sobre el efecto del 0A en el factor de segregación de glutamato en la población de C. intermedium C 3.

El fenómeno de la transferibilidad epidémica obedece a causas hasta ahora no bien definidas. Por ello resulta sugerente relacionar la capacidad de transferencia del factor S con los distintos tipos de células sg^- , los cuales pueden caracterizar diferentes tipos de poblaciones. Al parecer, hay un mecanismo tipo represor que bloquea la transferencia y que sólo se desarrolla después de una serie de generaciones

siguientes a la entrada de ADN plasmídico. Este mecanismo volvería a reprimirse como consecuencia de un sistema de inmunidad dependiente de la integración. Según éste, después de desintegrarse existiría una fase de susceptibilidad que comprendería tanto la capacidad de entrada de material extracromosómico, como la de transferibilidad una vez que se hubiese multiplicado.

En conjunto, con anterioridad a los experimentos a los que se hace referencia a continuación, se pensaba en dos estados del epísona, integrado y autónomo, que corresponderían respectivamente a las formas sg^+ y sg^- . Pero se necesitaba alguna prueba más directa de la existencia del estado integrado. Esa prueba surgió al comprobar un efecto aparentemente contradictorio del OA, denominado por ello "efecto paradójico". La prueba del estado autónomo residía en el efecto habitual del OA.

En los Cuadros 4.4A y 4.4B se especifican las condiciones en las que se llevaron a cabo los respectivos experimentos, según las cuales podía variar totalmente el efecto del OA. Cuando se partía de poblaciones que habían comenzado con un pequeño inóculo (1 a 100 células/ml), incubadas durante corto tiempo (12 h), se obtenía una clara reducción (88%) de la fracción de colonias A con relación a la correspondiente a la población normal (Cuadro 4.4B). Cuando se partía de grandes inóculos (10^4 células/ml) y se incubaba durante tiempos más largos (12 a 72 h), se obtenía un significativo aumento (25% con respecto a la población no tratada con OA). En ambos casos, el subcultivo posterior en M 1

sin 0A llevaba a una población idéntica a la inicial.

Estos experimentos demostraron que el efecto del 0A sobre la frecuencia de elementos sg^+ dependía del tamaño de la población de partida. Dado por supuesto el carácter episómico del factor S, cabía esperar que el 0A podría eliminarlo en mayor o menor grado. Pero el hecho de que primeramente se observase un aumento significativo de la frecuencia de colonias A—ya que los experimentos realizados con anterioridad fueron los señalados en los cuadros 4.4.1 y 4.4.2—resultaba a primera vista contradictorio, pues se pensaba que el 0A podía disminuir o dejar invariable la frecuencia de colonias A, pero no tenía por qué aumentarla.

Se pudo comprobar que la justificación del efecto paradójico estaba en que las poblaciones que daban altos porcentajes de A crecían mucho más rápidamente. Un cálculo aproximado de μ entre las 3 y las 16 h de cultivo daba unos valores de 0,90 h y 1,25 h para poblaciones cuyo posterior análisis colonial registraba un 80-100 % y un 10-30 % de colonias A, respectivamente. Si las células supuestamente sin episoma o con pocos episomas se multiplican más lentamente en M 1 que las células con el episoma integrado (sg^+), la frecuencia de estas últimas irá aumentando, y esto es lo que ocurre en un gran inóculo, en el que inicialmente ya hay algún elemento sg^+ .

Pueden admitirse, por tanto, tres tipos de células como probables componentes de una colonia C:

1) células con un episoma autónomo (o con muchos), 2) células sin episoma (o con muy pocos), y 3) células con un único episoma integrado; es importante tener en cuenta que la probabilidad de formarse una célula de este último tipo no es la misma para todos los elementos sg^- .

El efecto paradójico del 0A ha servido para confirmar directamente que son los elementos sg^+ los que tienen integrado el factor S, puesto que estas formas segregadoras no son sensibles al 0A. Además, este hecho ha servido para seleccionar poblaciones ricas en elementos sg^+ , y en elementos sg^- , utilizando respectivamente los efectos paradójico y normal del 0A, tal como se describe en 4.7.2.

Los efectos de la irradiación ultravioleta (rUV) sobre las bacterias se deben fundamentalmente a su acción sobre el ADN. El efecto más importante es la formación de dímeros estables entre dos restos de timina adyacente, que bloquean la reduplicación del ácido nucleico. No todos los dímeros tienen efecto letal. El ADN puede ser restaurado como consecuencia de la puesta en marcha de dos tipos diferentes de mecanismos: la fotoreactivación y la reactivación negra.

Han sido citados algunos factores episómicos que determinan una menor sensibilidad a la rUV de la célula huésped. Por tanto, existía la posibilidad de encontrar una supervivencia diferencial en relación con la riqueza en

elementos sg^+ de diversas poblaciones de C. intermedium C 3.

En los casos citados en la literatura se estudia el efecto de la rUV sobre células con episomas en estado libre. Las poblaciones de C. intermedium C 3 seleccionadas con muchos elementos sg^+ (factor S integrado), pueden presentar un comportamiento diferente de las que tienen el factor S fundamentalmente en estado plasmático.

Puede considerarse que en cada célula bacteriana existen n grupos químicos que pueden ser alterados por efecto de la rUV. Los cambios producidos por la radiación dependen, en razón directa, de la dosis y de n . Las curvas de supervivencia de la Figura 5.3.2 corresponden a poblaciones idénticas con respecto al ADN cromosómico, pero con concentraciones crecientes de ADN episómico. De acuerdo con ellas, el tamaño del blanco disminuye cuando la concentración de ADN extracromosómico se hace mayor.

Las familias de curvas representadas en las figuras 5.3.2 y 5.4.2 y 5.5.2a indican que la mínima capacidad de restauración, tanto después de siembra directa como de fotorreactivación o reactivación negra (con un periodo de tiempo variable de "Liquid Holding Recovery"), corresponde a la población con menor cantidad de factor S, mientras que la supervivencia aumenta a medida que se hace mayor la concentración episómica. La influencia de la concentración del factor S en la restauración de las lesiones químicas ocasionadas por la rUV es particularmente sugerida a través de la comparación de

la Figura 5.3.2 con las curvas de supervivencia de E. coli B (Figura 5.7a) obtenidas por ROBERTS y ALDOUS - (1949) cuando después de la irradiación se sometían a reactivación negra. La semejanza entre los dos grupos de curvas es aparente. En un caso se aprecia el efecto de tiempos crecientes de recuperación negra y en el otro el de cantidades crecientes de material episómico. Este mismo efecto se aprecia también, sólo para el caso de C. intermedium C3 al comparar las curvas de las figuras 5.3.2 y 5.5.2a.

Con la observación de las gráficas citadas no es posible conocer una diferencia de efecto protector entre los estados integrado y autónomo del episoma. Pero si se representan los valores de la supervivencia en función del porcentaje de colonias A de la población (Figura 5.7b) se puede apreciar que la protección crece más rápidamente para las poblaciones con altos porcentajes. Esto hace suponer que la acción protectora del episoma integrado es mayor que en estado libre. Es decir, que aunque la protección por efecto trans también es posible, es mucho mayor por efecto cis. Esto vendría a indicar que, además de la concentración de los enzimas de reparación, en el mecanismo de protección local sobre el ADN episómico intervienen uno o varios genes operadores.

Los resultados de los análisis coloniales efectuados después de la rUV (5.6.1) no indican un efecto significativo independiente sobre el factor S, y su capacidad de integración al cromosoma. Por tanto no puede afirmarse

una acción directa sobre el episoma. Sin embargo, tal como se ha establecido, es notoria la modificación del efecto de la rUV sobre el cromosoma bacteriano según sea la concentración de ADN extracromosómico, principalmente en posición cis.

Finalmente, debe señalarse que los experimentos de inactivación por rUV y restauración posterior han constituido una prueba totalmente independiente de la heterogeneidad de las poblaciones de C. intermedium C 3 que, hasta ahora, sólo había estado condicionada a la propiedad de segregar aminoácidos.

7 CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo el análisis del desarrollo colonial de Micrococcus glutamicus ATCC 13032 previo estudio de las condiciones adecuadas de crecimiento y revelado - con Leuconostoc mesenteroides P-60. Si bien alrededor de todas las colonias puede detectarse la presencia de glutamato, se han puesto en evidencia diferencias suficientemente importantes entre ellas como para considerar que la población de M. glutamicus que crece en los medios de UDAKA y Bacto-Glutamic Assay no es homogénea con relación a la segregación del referido aminoácido.

2. Se ha realizado el análisis colonial con relación a la segregación de glutamato en cinco cepas de colección (ATCC) taxonómicamente afines a Citrobacter Intermedium C 3 llegándose a la conclusión de que en ninguna de ellas tiene lugar la liberación al medio del referido aminoácido.

La segregación de aminoácidos observada en C. intermedium C 3 es un fenómeno singular de la cepa, sobre el cual existen evidencias experimentales que sugieren su origen episómico. Se estudian las anteriores cepas de coliformes con intención de utilizarlas ulteriormente como aceptores para la transferencia episómica. Se concluye que la cepa Paracitobacterium intermedium ATCC 11606 es la más favorable.

3. Se han fijado las condiciones de desarrollo y revelado con la cepa P 60 de L. mesenteroides para el crecimiento de C. intermedium C 3 en el medio M 1 con sustitución total de la glucosa por α -cetoglutarato. Se confirma la homogeneidad colonial, correspondiente a colonias del tipo A, consecuente a dicho desarrollo, al igual que el obtenido previamente por otros autores por sustitución parcial de la glucosa. Se comprueba que todas las células de la población obtenida en M 1 puede desarrollarse en M 1 α -cetoglutarato.

4.1. Se confirma la equivalencia de los análisis coloniales de la misma población en M 1 y M 1-citrato.

4.2. Se describe una disociación colonial "gigante" dependiente del desarrollo en M 1-citrato y distinto a otras disociaciones inducidas por el mismo sustrato y consignadas con anterioridad por otros autores. Se muestra cómo la formación de estas colonias gigantes es una característica fenotípica de C. intermedium C 3 relacionada, directa o indirectamente, con la dinámica del material episómico que

condiciona la segregación de glutamato. Se sugiere la intervención de un factor soluble cuya concentración en el medio depende de la concentración celular y de la frecuencia de colonias A. Se muestra cómo las colonias gigantes son colonias A gigantes, o super A.

5.1. La heterogeneidad colonial de C. intermedium C 3 se mantiene también cuando el rellenado del ciclo del ácido cítrico se lleva a cabo a partir de malato y succinato como únicas fuentes de carbono. Ambos sustratos incrementan la segregación de glutamato por célula sg+. El crecimiento en succinato requiere una adaptación previa.

5.2. La viabilidad en M 1-malato es significativamente menor que en M 1, con independencia del carácter sg+ o sg- de los individuos de la población.

6. La utilización de xilosa, glicerina y sorbitol como únicos sustratos no modifican la heterogeneidad colonial observada con la glucosa, y excluyen la posibilidad de utilización selectiva de la misma entre las formas sg+ y sg-.

7. C. intermedium C 3 utiliza más fácilmente el piruvato que la glucosa, produciendo acumulación de aminoácidos en el medio. El análisis colonial manifiesta una heterogeneidad comparable a la obtenida en M 1, pero la cantidad de glutamato liberado al medio exterior por célula parece ser ligeramente superior. El resultado obtenido con piruvato parece excluir toda diferencia entre sg- y sg+ relativa a la utilización de la glucosa con independencia del ci-

clo del ácido cítrico.

8. Los sistemas reguladores de la síntesis de glutamato que son afectados por el factor de carácter episómico descrito en C. intermedium C 3 parecen restringidos al sistema del isocitrato deshidrogenasa.

9. Se muestra cómo el anaranjado de acridina puede eliminar el factor S de la cepa C. intermedium C 3 y que su efecto depende de la frecuencia de elementos sg^+ en la población de partida.

10. El anaranjado de acridina permite seleccionar los elementos sg^+ como consecuencia de la relativa insensibilidad del episoma en estado integrado. Ello constituye la primera evidencia directa de la existencia de este estado para el factor S.

11. Las poblaciones seleccionadas con anaranjado de acridina en favor de los elementos no segregadores -reducción de la concentración plasmídica- son diferentes de las poblaciones constituidas por colonias C con pocos elementos segregadores. Se concluye que el plásmido en estado autónomo se halla normalmente en gran número por célula, en tanto que después del tratamiento con anaranjado de acridina este número queda reducido, con disminución concomitante de la probabilidad de pasar al estado integrado.

12. Se describen los métodos adecuados para obtener poblaciones ricas respectivamente en elementos sg^+ y sg^- .

13. Las curvas de supervivencia después de irradiación ultravioleta de poblaciones de C. intermedium C 3 - con una concentración creciente de ADN extracromosómico muestran que el tamaño del blanco disminuye en relación recíproca con la misma. Esto permite concluir que el factor S interviene de algún modo en la restauración del ADN cromosómico. Tiempos crecientes de recuperación negra presentan un efecto paralelo al de concentración creciente de material episómico.

14. El factor S puede reunirse con los episomas conocidos que aumentan la resistencia a la radiación ultravioleta, a diferencia de otros que no la modifican o la disminuyen. Entre los primeros se conocen algunos que confieren una protección relativa mayor y otros menor que el factor S.

15.1 No se ha encontrado ningún efecto significativo de la irradiación ultravioleta que pueda atribuirse a una acción directa sobre el factor S. Por lo tanto, no se ha podido disponer de una base adecuada para revelar si el factor S en estado autónomo es una cadena de ADN doble o simple.

15.2 Se ha aportado suficiente evidencia experimental que permite sugerir que la acción restauradora del factor S sobre el ADN cromosómico tiene lugar en posición cis y trans, pero es mucho mayor en el primer caso.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADLER, E., V. HELLSTROM, G. GUNTER y H. von EULER (1938). Z. physiol. Chem., Hoppe-Seyler's, 235, 14
- ASAI, T., K. AIDA, y K. OISHI (1957). Bull. Agri. Chem. Soc., 21, 134
- BERGEY'S (1957). Manual of Determinative Bacteriology. 7th edition. (Ed. por R.S. BREED et al.) The Williams & Wilkins Co, Baltimore.
- BRAUN, W. (1965). Bacterial Genetics. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- BRESLER, S.E., V.L. KALININ y D.A. PERUMOV (1964). Theory of Inactivation and Reactivation of Transforming DNA. Biopolymers, 2, 135-146
- BRESLER, S.E., V.L. KALININ y D.A. PERUMOV (1967) Inactivation and Mutagenesis on Isolated DNA. Mutation Res., 4, 389-398

- CAMPBELL, A.M. (1969). Episomes. Harper & Row. New York.
- CLOTET, R. y R. PARES (1962). Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. I Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.
- CLOTET, R. (1967). Producción directa de alanina por Citrobacter intermedium C 3. Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
- CLOTET, R., J. GUINEA y R. PARES (1968). Segregación de aminoácidos por una cepa de C. intermedium. Microbiol. esp., 21, 155-173
- CLOTET, R., J. GUINEA y R. PARES (1969). Producción de alanina por fermentación con C. intermedium C 3. Rev. esp. Fisiol., 25, 41-54
- CLOWES, R.C. y W. HAYES (1968). Experiments in Microbial Genetics. Blackwell, Oxford.
- DAGLEY, S., E.A. DAVES y G.A. MORRISON (1950). Nature, 165, 437
- DAVIS, B.D., R. DULBECCO, H.N. EISEN, H.S. GINSBERG y W.B. WOOD (1967). Microbiology. Harper & Row. New York.
- DEMAIN, A.L., M. JACKSON y N.R. TRENNER (1967). Thiamine-dependent Accumulation of Tetramethylpyrazine Accompanying a Mutation in the Isoleucine-Valine Pathway. J. Bacteriol., 94, 323-326
- DIFCO (1962). Supplementary Literature -to Difco Manual, 9th edition-. Difco Laboratories. USA.

- DIFCO (1963). Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids. Difco Laboratories, USA.
- DRABLE, W.T. y B.A. STOCKER (1968). R_L (Transmissible Drug-Resistance) Factors in Salmonella typhimurium: Pattern of Transduction by Phage P 22 and Ultraviolet-protection Effect. J. gen. Microbiol., 53, 109-123
- EDWARDS, P.R. y W.H. EWING (1964). Identification of Enterobacteriaceae (reimp. 2ª ed.). Burgess Pub. Co. Minneapolis.
- EPHRUSSI, B., H. HOTTINGUER y A.M. CHIMENENES (1949). Action de l'acridine sur les levures. I: La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur, 76, 351-367
- GANESAN, A.K. y K.C. SMITH (1968). Dark Recovery Processes in E. coli Irradiated with Ultraviolet Light, I. J. Bacteriol., 96, 2, 365-373
- GUERRERO, R. y R. PARES (1969a). Efecto paradójico del anaranjado de acridina contra la acción de un factor episómico de Citrobacter intermedium C 3. T. Soc. Cat. Biol., 27, 81-90
- GUERRERO, R. y R. PARES (1969b). Segregación de glutamato en C. intermedium C 3 como consecuencia de la presencia de un episoma en estado integrado. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

- GUERRERO, R. y R. PARES (1969c). Efecto del anaranjado de acridina sobre un episoma integrado de C. intermedium C 3. VI Jornadas Genéticas Luso-Españolas, Coimbra.
- GUINEA, J. y R. PARES (1962). Utilización de azúcares por bacterias del suelo. I Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.
- GUINEA, J. (1966). Estudio sobre segregación de aminoácidos en E. intermedia C 3 y su condicionamiento genético. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- GUINEA, J. y R. PARES (1966). Naturaleza mutacional de un dualismo metabólico en un coliforme. III Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Madrid.
- GUINEA, J. y R. PARES (1969). Segregación de glutamato en C. intermedium C 3 como característica genética que puede adquirirse por infección. II Congreso Nacional de Microbiología, Madrid.
- GUINEA, J. (1970). Análisis colonial de la producción de ácido glutámico por C. intermedium C 3. Microbiol. esp. (en prensa)
- HANAWALT, P.C. (1968). Cellular Recovery from photochemical damage. "Photophysiology" (Ed. por A.C. Giese). Vol. 4, p. 204. Academic Press. New York.
- HAYES, W. (1968). The Genetics of Bacteria and their Viruses 2nd edition. Blackwell. Oxford.
- HERNANDEZ, S. (1968). Segregación de glutamato en C. intermedium C 3 como propiedad determinada por la presen-

- cia de un factor episómico. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- HERNANDEZ, S. Y R. PARES (1969). Interconversión genética de formas segregadoras y no segregadoras de aminoácidos en poblaciones de Citrobacter intermedium C 3 T. Soc. Cat. Biol., 27, 71-80
- HERNANDEZ, S. (1970). Heterogeneidad colorial de C. intermedium C 3 en relación a la segregación de alanina. Microbiol. esp. (en prensa)
- HIROTA, Y. y T. IJIMA (1957). Acriflavine as an effective agent for eliminating F factor in Escherichia coli. Nature, 180, 655
- HIROTA, Y. (1960). The effect of acridine dyes on mating type in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46, 57-64
- HOWARD-FLANDERS, P. (1968). DNA. Repair. Ann. Rev. Biochem., 37, 175
- HOWARTH, S. (1965). Resistance to the Bactericidal Effect of Ultraviolet Radiation Conferred on Enterobacteria by the Colicine Factor Coll. J. gen. Microbiol., 40, 43-55
- HOWARTH-THOMPSON, S. (1966). Influence of various coll factors on the lethal and mutagenetic effects of ultraviolet radiation. Proc. Univ. Otago med. Sch., 44, 5
- INDEX BERGEYANA (1966). Ed. por R.E. Buchanan, J.G. Holt y E.F. Lessel. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

- JACOB, F. y E.L. WOLLMAN (1958). Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. Compt. Rend., 247, 154-156
- JACOB, F. y J. MONOD (1961). Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. J. Mol. Biol., 3, 318-356
- KAHN, P.L. (1969). Evolution of a Site of Genetic Homologie on the Chromosome-Episome of Escherichia coli. J. Bacteriol., 100, 269-275
- KINOSHITA, S., S. UDAKA y M. SHIMONO (1957). Studies on the amino acid fermentation. I: Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol., 3, 193-205
- KINOSHITA, S., K. NAKAYANA y S. AKITA (1958). Taxonomical Study of Glutamic Acid Accumulating Bacteria, Micrococcus glutamicus, nov. esp. Bull. Agri. Chem. Soc. Japan, 22, 176-185
- KINOSHITA, S. (1959). The production of Amino Acid by Fermentation Processes. Advances in Applied Microbiology; vol. I. Academic Press. New York.
- KINOSHITA, S., S. ITAGAKI y M. FURUKAWA (1959). Cell Growth. I.A.M. Symposia of Microbiology, 1, 146-172. Institute of Applied Microbiology. Tokyo.
- KINOSHITA, S., S. ITAGAKI y K. NAKAYAMA (1960). Amino Acids; 2, 42-57. Association of Amino Acid Fermentation. Institute of Applied Microbiology. Tokyo.
- KINOSHITA, S. (1963). Aminoacids. "Biochemistry of Industrial Microorganisms". (Ed. por C. Rainbow y A.M. Rose) Academic Press. London.

- LEDERBERG, J. y E.M. LEDERBERG (1952). Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. J. Bacteriol., 63, 399-406
- LOWESTEIN, J.M. ed. (1969). Citric Acid Cycle. Vol. XIII: Methods in Enzymology. (Ed. por S.P. Colowick y N.O. Kaplan). Academic Press. New York.
- LURIA, S.E. y M. DELBRUCK (1943). Mutation of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. Genetics, 28, 491-511
- MARSH, E.B. y D.H. SMITH (1969). R Factors Improving Survival of Escherichia coli K 12 after Ultraviolet irradiation J. Bacteriol., 100, 128-139
- OTSUKA, S., R. MIYAJIMA e I. SHIIO (1965). Comparative Studies on the Mechanism of Microbial Glutamate Formation. J. Gen. Appl. Microbiol., 11, 285-301
- PARES, R. y R. CLOTET (1963). Producción de aminoácidos por microorganismos. Química e Industria, 10, 98-99
- PARES, R., J. GUINEA y CLOTET (1965). Excreción de aminoácidos por un coliforme. III Reunión de Bioquímicos Españoles. Oviedo.
- PARES, R. y J. GUINEA (1969a). Transferencia interespecífica del factor que condiciona la secreción de glutamato en C. intermedium C 3. Anales de la Estación Experimental

de Aula Dei, 9, 287-296

PARES, R. y J. GUINEA (1969b). El factor S de C. intermedium C 3 como nuevo tipo de plásmido. II Congreso Nacional de Microbiología, Madrid.

PERDIGO, M.T. (1969). Comunicación personal.

PRITCHARD, R.H. (1969). Control of Replication of Genetic Material in Bacteria. "Bacterial Episomes and Plasmids -A Cyba Foundation Symposium-". (Ed. por G.E.W. Wolstenholme y M. O'Connor). J. & A. Churchill Ltd. London.

RAMOS, A., J. GUINEA y R. PARES (1968). The Transfer of a Factor which determines glutamate Secretion from C. intermedium C 3 to P. intermedium ATCC 11606. J. gen. Microbiol., 55, xii

ROBERTS, R.B. y E. ALDOUS (1949). J. Bacteriol., 57, 363. (Citado en Smith y Hanawalt, 1969; p. 134).

ROTH, M.M. (1967). Carotenoid Pigments and Photokilling by Acridine Orange. J. Bacteriol., 93, 506-507

SANCHO, J. y R. PARES (1969). Análisis adansoniano de coliformes del grupo intermedio. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid

SANCHO, J. (1970). Trabajo en curso.

SCAIFE, D. (1967). Episomes. Ann. Rev. Microbiol., 21, 601-638

- SCHWARTZ, D. (1963). *Methodes Statistiques*. Flammarion, Paris.
- SETLOW, R.B. y W.L. CARRIER (1966). Pyrimidine Dimers in ultraviolet irradiated DNA's. J. Mol. Biol., 17, 237-254
- SETLOW, R.B. (1968). The Photochemistry, photobiology and repair of Polynucleotides. Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 8, 257
- SHIIO, I., S. OTSUKA y M. TAKAHASHI (1962). J. Biochem., 51, 56
- SHIIO, I., S. OTSUKA y N. KATSUYA (1963). J. Biochem., 53, 333
- SICCARDI, A.G. (1969). Effect of R Factors and Other Plasmids on Ultraviolet Susceptibility and Host Cell Reactivation Property of Escherichia coli. J. Bacteriol., 100, 337-346
- SMITH, K.C. y P.C. HANAWALT (1969). *Molecular Photobiology*. Academic Press. London.
- STEEL, SABERLICH, REYNOLDS y BAUMANN (1949) J. Biol. Chem., 177 533
- THOMPSON, D.H. (1931). The side-chain theory of the Structure of the gene. Genetics, 16, 267-290
- UDAKA, S. (1960). Screening Method for Microorganisms Accumulating Metabolites and its Use in the Isolation of Micrococcus glutamicus. J. Bacteriol., 79, 754-755

- URGELL, J.B. y R. PARES (1969). Actividad isocítrico deshidrogenásica en preparados solubles de diferentes poblaciones de C. intermedium C 3. T. Soc. Cat. Biol., 27, 91-99
- URGELL, J.B. (1970). Drenaje del ciclo del ácido cítrico por efecto cis de un factor episómico. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- VALOIX, J. y R. PARES (1969a). Los dos efectos del anaranjado de acridina sobre la frecuencia de células segregadoras de glutamato en C. intermedium C 3. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.
- VALOIX, J. (1969b). Comunicación personal.
- VALOIX, J. (1970). Comunicación personal.
- WATANABE, T. y T. FUKASABA (1961). Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. II: Elimination of resistance factors with acridine dyes. J. Bacteriol., 81, 697-683
- WATANABE, T. (1963). Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. Bacteriol. Rev., 27, 87-115
- WOOD, W.A. (1961). Fermentation of Carbohydrates and Related Compounds. "The Bacteria". (Ed. por I.C. Gunsalus y R.Y. Stanier). Vol. II, pp. 59-149. Academic Press. New York.

El retrato de Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) corresponde a un grabado en cobre de A. de Blois, derivado del óleo de Johannes Verkolje (1686, actualmente en el Rijksmuseum, Amsterdam). Apareció por primera vez en "Vervolg der Brieven" (Leiden, 1687), con una inscripción en holandés, traducida después al latín en "Arcana Naturae Detecta" (Delft, 1695).

Es un facsímil de la edición que se conserva en el Instituto Botánico de Barcelona (Colección Salvador) de "A. N. D. Editio novissima, auctior et correctior" (Leiden, 1722) que es el Tomo III de la "Opera Omnia" (Col. Salv.) e incluye las cartas escritas entre 1680 y 1695. *