

Influencia del cloranfenicol en la excreción de glutamato por *Citrobacter intermedius* C3

A. Juárez, J. Vives-Rego, J. Imperial, J. Ripoll y R. Parés *

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Barcelona-7

(Recibido el 29 de julio de 1980)

A. JUAREZ, J. VIVES-REGO, J. IMPERIAL, J. RIPOLL and R. PARES. *Influencia of Chloramphenicol on Glutamic Acid Excretion in Citrobacter intermedius C3*. Rev. esp. Fisiol, 37, 153-158. 1981.

Chloramphenicol inhibits growth of *C. intermedius* C3 along with glutamic acid excretion, isocitrate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and the percentage of glutamic acid excreting colonies in solid medium. Repression of isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase may explain the observed decrease in extracellular glutamic acid accumulation even when media were supplemented with 2-oxoglutarate, a known inducer of excretion in *C. intermedius* C3.

Citrobacter intermedius C3 excreta aminoácidos (mayoritariamente ácido glutámico) cuando crece en un medio mineral con glucosa. Trabajos previos han puesto de manifiesto que la capacidad excretora de ácido glutámico de *C. intermedius* C3 está mediatizada por la presencia de un factor extracromosómico (denominado factor S) transmisible por conjugación y transformación (5, 7, 8). Durante la asimilación de amonio en procariotas los dos enzimas mayoritariamente implicados en la síntesis de glutamato son la glutamato deshidrogenasa y la glutamato sintasa (2, 9). Ambos enzimas son sinteti-

zados por *C. intermedius* C3 pero no están directamente relacionados en la regulación de la excreción de ácido glutámico (8). Por otro lado, la adición de 2-oxoglutarato al medio de cultivo potencia la excreción en la cepa salvaje C3 e induce la excreción en las mutantes no excretoras, sugiriéndose que las diferencias en la capacidad de excretar glutamato de las poblaciones de *C. intermedius* C3 puedan ser debidas a los mecanismos que regulan la disponibilidad del 2-oxoglutarato intracelular (12). En estas condiciones la isocitrato deshidrogenasa aparece como el principal enzima implicado en la síntesis de 2-oxoglutarato.

La utilización de cloranfenicol en medios minerales con glucosa incrementa la acumulación de aminoácidos en el medio

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

e intracelularmente en enterobacteriáceas y otros microorganismos (1). El estudio de la influencia del cloranfenicol en el crecimiento de *C. intermedius* C3 se ha considerado útil para investigar la regulación de la excreción de glutamato en *C. intermedius* C3.

En este trabajo se estudia el efecto del cloranfenicol sobre el crecimiento, la excreción de ácido glutámico a nivel colonial y en medio líquido y sobre los niveles celulares de glutamato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa.

Material y métodos

Cepas bacterianas. *Citrobacter intermedius* C3 es la cepa salvaje, presenta disociación reversible respecto a la excreción de glutamato a nivel colonial, cuyas características se han descrito previamente (4, 7, 11). La cepa CBC356 es una mutante Pro⁻ His⁻ obtenida por tratamiento con nitrosoguanidina, no presenta el fenómeno de disociación colonial, siendo todas las colonias excretoras de glutamato. La cepa CBC315 se ha obtenido por tratamiento con nitrosoguanidina, requiere prolina para el crecimiento y no excreta glutamato ni a nivel colonial ni en medio líquido (7, 17). La cepa salvaje C3 y la cepa CBC356 presentan una banda de ácido desoxirribonucleico plasmídico por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio y bromuro de etidio, mientras que la cepa CBC315 sólo presenta la banda de baja densidad correspondiente al ácido desoxirribonucleico cromosómico observada en la cepa salvaje C3 y la cepa CBC356 (7).

Leuconostoc mesenteroides P60 es la cepa ATCC 8042.

Medios y condiciones de cultivo. El crecimiento tiene lugar sobre el medio M1 con sales minerales y glucosa y sobre el medio M1- α que contiene glucosa y 2-oxoglutarato como substratos energéti-

cos; ambos medios han sido previamente descritos (8). Para el desarrollo de las mutantes auxotróficas el medio se suplementa con 20 mg l⁻¹ del aminoácido correspondiente. El desarrollo y la excreción se estudian en matraces de 500 ml con 150 ml del medio correspondiente. La incubación se efectúa a 30° C en agitación (125 oscilaciones min⁻¹). El crecimiento se determina por incremento de la densidad óptica a 500 nm.

Determinación de ácido glutámico. Las determinaciones de ácido glutámico a nivel colonial en medio sólido se efectúan cualitativamente utilizando el crecimiento de la cepa auxotrófica para el ácido glutámico *Leuconostoc mesenteroides* P60, siguiendo el método previamente descrito por GUINEA (5). La determinación cuantitativa de ácido glutámico en el medio líquido se efectúa por análisis del sobrenadante obtenido por centrifugación del medio a 7.500 \times g (10 min, 4° C) y posterior filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 μ de diámetro de poro. La valoración de L-glutámico se efectúa enzimáticamente con glutamato deshidrogenasa, midiéndose colorimétricamente la aparición de formazano, que tiene lugar al reaccionar el NADH generado por la glutamato deshidrogenasa con el cloruro de yodonitrotetrazolio en presencia de diaforasa, utilizando el método «L-glutamic acid test-combination» de Boehringer Mannheim N.° Cat. 139092.

Determinaciones de la actividad enzimática. La obtención de extractos crudos se ha descrito previamente (12), así como la determinación de actividad glutamato deshidrogenasa (8). La actividad isocitrato deshidrogenasa se determina siguiendo la reducción del NADP a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 25, en cubetas que contienen: tampón Tris-HCl, pH 8, 100 mM; MnCl₂, 1,3 mM; DL-isocitrato 3,3 mM; NADP⁺ 0,33 mM; 0,1 ml de extracto crudo y agua destilada

hasta 3 ml. La actividad específica se expresa en nmol de coenzima convertido por minuto y por mg de proteína determinada por el método de SCHACTERLE y POLLACK (15) usando albúmina sérica bovina como patrón.

Análisis estadístico de los datos. Se ha empleado un análisis de la varianza para un diseño de tres factores y réplicas con interacción. Las estimaciones mínimo cuadráticas de los parámetros por el método de Gauss-Markov (16).

Resultados

Desarrollo en presencia de cloranfenicol. El cloranfenicol inhibe el desarrollo de la cepa salvaje C3, CBC315, CBC356 proporcionalmente a la concentración de antibiótico entre 0 y 1 $\mu\text{g/ml}$. No se ha puesto de manifiesto una acción diferencial entre las cepas estudiadas tanto en el medio M1 como en el M1- α . La adición de 2-oxoglutarato al medio no altera la inhibición producida en ningún caso (fig. 1).

La excreción de glutamato a nivel colonial en presencia de cloranfenicol. El porcentaje de colonias excretoras de glutamato en la cepa salvaje C3 y CBC356 baja significativamente en presencia de cloranfenicol. En el medio M1 la reducción en el número de colonias excretoras en la cepa salvaje C3 es del 17,5 % a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y del 25 % con 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en el medio M1- α la reducción es del 10 % con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y 25 % con 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. En el medio M1 la cepa CBC356 reduce el número de colonias excretoras en un 15 % con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y en un 25 % con 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol; en el medio M1- α la reducción es del 8 % con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y del 20 % con 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Cuando la cepa CBC315 crece en M1- α , la reducción en el número de colonias excretoras es del 9 % con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol y del 25 % con 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (tabla I). El tiempo habitual de incubación previo a la operación de detección de glutamato por el desarrollo de *Leuconostoc mesenteroides* es de 16-24 h, en el caso de la

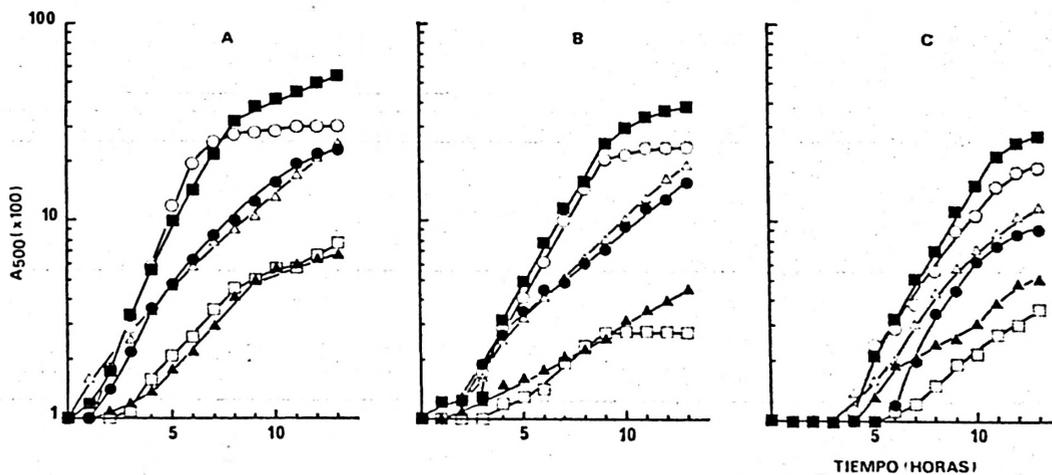


Fig. 1. Desarrollo de *C. intermedius* C3 en presencia de cloranfenicol. A) Cepa salvaje C3. B) Cepa CBC356. C) cepa CBC315. (O—O) medio M1 (Δ—Δ) M1 + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. (□—□) medio M1 + 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. (■—■) medio M1 α (●—●) medio M1 α + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. (▲—▲) medio M1 α + 1 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol.

Tabla I. *Efecto del cloranfenicol en la excreción de glutamato a nivel colonial en las cepas C3, CBC356 y CBC315.*

Los valores numéricos expresan los porcentajes de colonias excretoras. % r.c. = porcentaje de la reducción de colonias excretoras obtenidas en el medio suplementado con cloranfenicol respecto al medio sin cloranfenicol M1 y M1 α medios de cultivo según material y métodos.

Cepas	M1	M1-a	% r.c.	M1-b	% r.c.	M1 α	M1 α -a	% r.c.	M1 α -b	% r.c.
C3	80	70	17,5	60	25	100	90	10	75	25
CBC356	100	85	15	75	25	100	92	8	80	20
CBC315	0	0		0		100	91	9	75	25

a) y b) Medios suplementados con 0,5 y 1 μ g/ml de cloranfenicol, respectivamente.

utilización del cloranfenicol es de 48 h. Existe un claro efecto reductor del número de colonias excretoras de glutamato en cualquier cepa de C3. La reducción del porcentaje de colonias excretoras es directamente proporcional a la concentración de cloranfenicol y es equivalente en todas las cepas.

Se ha analizado estadísticamente la influencia de los factores cepa, medio y concentración de antibiótico, en los resultados de la tabla I. El método estadístico utilizado con los datos originales ha sido un análisis de la varianza para tres factores y réplica con interacción. Para

un nivel de significación de 0,01, los tres factores influyen sobre los resultados. En cuanto a las interacciones, el tipo de medio no influye sobre el efecto del antibiótico y viceversa. El factor cepa no interacciona con el factor antibiótico, lo cual sugiere que el factor S no interviene en el efecto del cloranfenicol. La interacción cepa-medio es significativa como era de esperar.

Efecto del cloranfenicol en la excreción de glutamato en medio líquido. El desarrollo en medio líquido en presencia de cloranfenicol reduce la excreción de

Tabla II. *Efecto del cloranfenicol en la excreción de glutamato en medio líquido.*

Cepa	Medio	Tiempo de cultivo			
		24 h		48 h	
		Glutamato ^a	% reducción ^b	Glutamato ^a	% reducción ^b
C3	M1	0,981		1,051	
	M1-c	0,400	59,2	0,887	25,6
	M1 α	3,892		8,111	
	M1 α -c	1,851	52,4	6,210	23,4
CBC356	M1	0,634		0,752	
	M1-c	0,466	26,4	0,613	18,4
	M1 α	3,17		9,52	
	M1 α -c	2,35	54,5	4,14	56,5
CBC315	M1	0		0	
	M1-c	0		0	
	M1 α	1,123		1,097	
	M1 α -c	0,64	43,0	0,925	15,6

a) Expresado en μ g de glutamato por μ g de proteína celular. b) Porcentaje de la reducción de la excreción de glutamato en el medio con cloranfenicol (0,5 μ g/ml) con respecto al medio sin cloranfenicol. c) Concentración final de cloranfenicol, 0,5 μ g/ml.

glutamato en las cepas estudiadas a 24 h y 48 h, tanto si el crecimiento tiene lugar en M1 como en M1- α . La disminución de la excreción oscila entre el 15,6 % y el 56,5 %, variando en función de la cepa, medio de cultivo y tiempo de incubación (tabla II). En la cepa salvaje C3 y en la CBC315 la disminución del ácido glutámico excretado es superior en el medio M1- α que en el medio M1.

Determinaciones de isocitrato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa. Los niveles enzimáticos de isocitrato deshidrogenasa que se detectan en las cepas de C3, CBC356 y CBC312 son sensiblemente superiores a los evidenciados en otras enterobacteriáceas.

La incorporación de cloranfenicol reduce drásticamente el nivel celular de esta enzima. La glutamato deshidrogenasa se detecta a un nivel equivalente al de otras enterobacteriáceas, inhibiéndose notablemente cuando la incubación se efectúa en presencia de cloranfenicol. Sin embargo,

Tabla III. *Determinaciones de Isocitrato deshidrogenasa (IC) y glutamato deshidrogenasa (GD).*

Los valores numéricos expresan la actividad específica y son el valor medio de cuatro experiencias independientes; la desviación típica en ningún caso ha sido superior al 10 % de la media.

Cepa	Medio	IC	% reducción (a)	GD	% reducción (a)
Salvaje C3	M1	0,810		0,334	
	M1-c	0,028	96,5	0,080	76
	M1 α	0,680		NR	
	M1 α -c	0,022	96,7	NR	
CBC356	M1	0,480		0,314	
	M1-c	0,011	97,7	0,094	70
	M1 α	0,280		NR	
	M1 α -c	0,000	100	NR	

a) Expresa el porcentaje de reducción de actividad específica en el medio con cloranfenicol respecto al medio sin cloranfenicol. c) 0,5 μ g/m de cloranfenicol. NR = ensayo no realizado.

la reducción del nivel enzimático es superior para la isocitrato deshidrogenasa comparativamente a la glutamato deshidrogenasa (tabla III).

Discusión

La adición de cloranfenicol (0,5 μ g/ml) al medio inhibe parcialmente el crecimiento de *C. intermedius* C3 y reduce la excreción de glutamato. Contrariamente, en *E. coli* y otras enterobacterias la inhibición del crecimiento por cloranfenicol incrementa la acumulación de aminoácidos, ácido glutámico incluido (14).

La acción inhibitoria del cloranfenicol se basa fundamentalmente en su unión específica a la unidad 50S de los ribosomas, inhibiendo la transpeptidización y presentando también un efecto inhibitorio sobre la peptidil transferasa (1, 13). De este modo, muchos enzimas pueden ser inhibidos específicamente. En *C. intermedius* C3 el cloranfenicol inhibe la glutamato deshidrogenasa y, en mayor medida, la isocitrato deshidrogenasa. Dado que la glutamato deshidrogenasa está implicada en la síntesis de glutamato en *C. intermedius* C3 (8) y la variabilidad en la excreción de glutamato se supone relacionada con el sistema isocitrato deshidrogenasa (12), la represión del nivel intracelular de estas enzimas podría explicar la reducción de la excreción de glutamato en el medio M1.

La reducción de la excreción en el medio M1- α con cloranfenicol no puede explicarse por reducción del nivel de isocitrato deshidrogenasa, puesto que el 2-oxo-glutarato ya se incorpora al medio de cultivo; en este caso, la reducción del nivel de glutamato deshidrogenasa incidiría directamente en la síntesis de glutamato, limitándose la excreción por reducción del nivel intracelular del aminoácido.

El posible aumento de aminoácidos intracelulares por efecto de la inhibición

del cloranfenicol señalado por otros autores (14), no podría compensar la reducción del nivel de isocitrato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa.

Previamente se ha descrito que el cloranfenicol amplifica el número de copias de plásmidos tipo Col y R en *Escherichia coli* (3, 10) y *Proteus mirabilis* (6). La posibilidad de un efecto semejante sobre el factor S en *C. intermedius* C3 parece poco probable por: a) el efecto de amplificación se presenta a concentraciones de cloranfenicol del orden de $100 \mu\text{g/ml}^{-1}$ e inhibición total del crecimiento celular. Los experimentos con *C. intermedius* C3 se efectúan a concentraciones parcialmente inhibitorias. b) El fenómeno de amplificación del factor S debería incrementar y no disminuir la excreción. c) El factor S no tiene influencia sobre el efecto del cloranfenicol de acuerdo con lo expresado en el apartado de resultados.

Resumen

El cloranfenicol inhibe el desarrollo de *C. intermedius* C3 reduciendo la excreción de glutamato en medio líquido, el número de colonias excretoras de glutamato en medio sólido y los niveles de isocitrato deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa. La represión de estos dos enzimas puede explicar la disminución en la acumulación de ácido glutámico extracelular incluso en medios suplementados con 2-oxoglutarato, que en ausencia de antibiótico incrementa cuantitativamente la excreción.

Bibliografía

1. BROCK, T. D.: *Bacteriol. Rev.*, **25**, 32-48, 1961.
2. BROWN, C. M., MACDONALD-BROWN, D. S. y MEERS, J. L.: *Adv. Microbial. Physiol.*, **11**, 1-52, 1974.
3. CLEWELL, D. B.: *J. Bacteriol.*, **110**, 667-676, 1972.
4. CLOTET, R., GUINEA, J. y PARÉS, R.: *Microbiol. Esp.*, **21**, 155-173, 1968.
5. GUINEA, J.: *Microbiol. Esp.*, **23**, 13-23, 1970.
6. HASHIMOTO, H. y RONND, R. H.: *J. Bacteriol.*, **123**, 56-68, 1975.
7. JOFRE, J., PRIETO, M.-J., TOMÁS, J. y PARÉS, R.: *J. Bacteriol.*, **138**, 721-725, 1979.
8. JUÁREZ, A., PARÉS, R. y VIVES, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **33**, 217-220, 1977.
9. MEERS, J. L., TEMPEST, D. W. y BROWN, C. M.: *J. Gen. Microbiol.*, **64**, 187-194, 1970.
10. NORGARD, M. V., EMIGHOLZ, K. y MONAHAN, J. J.: *J. Bacteriol.*, **138**, 270-272, 1979.
11. PARÉS, R., GUINEA, J., HERNÁNDEZ, S., VALLOIX, J. y JOFRE, J.: *J. Bacteriol.*, **119**, 9-18, 1974.
12. PARÉS, R., JOFRE, J., JUÁREZ, A. y VIVES-REGO, J.: *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 169-171, 1979.
13. PESTKA, S.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 488-562, 1971.
14. RAUNIO, R. P. y LEPPAVIRTA, M.: *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 141-149, 1975.
15. SCHACTERLE, G. R. y POLLACK, R. L.: *Analyt. Biochem.*, **51**, 654-655.
16. SCHEFFE, H.: En «The analysis of variance». J. Wiley & Sons, Londres, 1959.
17. VIVES-REGO, J., JOFRE, J., IMPERIAL, J., RIPOLL, J. y PARÉS, R.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 473-478, 1979.