

Efecto de la metionín sulfona sobre el crecimiento de *Citrobacter intermedius* C₃

A. Juárez, R. Parés y J. Vives

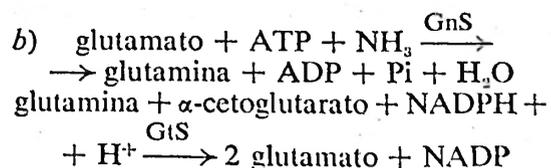
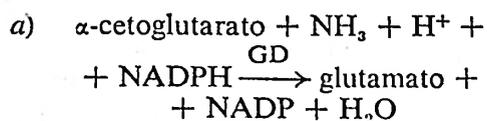
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona
Barcelona-7

(Recibido el 20 de diciembre de 1976)

A. JUAREZ, R. PARES and J. VIVES. *Effect of Methionine Sulfone on the Growth of Citrobacter intermedius* C₃. Rev. esp. Fisiol., 33, 217-220. 1977.

Specific activity of glutamate dehydrogenase (GD) and glutamate synthase (GtS) has been determined in the wild strain C₃ and on a non excreting pro⁻ mutant strain. Methionine sulfone shows inhibitory effects on their growth. The addition of α -ketoglutarate to the medium prevents the inhibitory effect and increases the GtS specific activity in both strains. The physiological effect of methionine sulfone and its suppression by α -ketoglutarate is discussed.

Se ha puesto de manifiesto que en procariontes existen al menos dos vías metabólicas relacionadas con la síntesis de glutamato, cuando el crecimiento tiene lugar asimilando amonio exclusivamente (5). La primera (a) tiene lugar a través de la glutamato deshidrogenasa (GD). La segunda vía metabólica (b) implica la glutamina sintetasa (GnS) y la glutamato sintasa (GtS).



Citrobacter intermedius C₃ es una bacteria caracterizada por excretar glutamato al medio, cuando un factor episómico (factor S) adopta el estado integrado (6). Esta particular conexión entre el fenómeno genético y fisiológico sugiere la posible implicación de los mecanismos de síntesis de glutamato antes expuesto. Esta posibilidad adquiere especial significación debido a que estas propiedades se expresan cuando *Citrobacter intermedius* C₃ se desarrolla en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono y energía y amonio como exclusiva fuente de nitrógeno.

La GnS y GtS son inhibidas irreversiblemente por la metionín sulfona (MSF) (1). Consecuentemente la inhibición específica de b) por un análogo estructural puede constituir un buen camino para va-

lorar el papel de *a*) y *b*) en estas condiciones de desarrollo.

En este trabajo se determinan las actividades GD y GtS, poniéndose de manifiesto el efecto de la MSF sobre el crecimiento de *Citrobacter intermedius* C₃. Se muestran resultados que indican la posibilidad de que ambas vías sean activas. Sin embargo, la inhibición del crecimiento con MSF y la supresión de su efecto con α -cetoglutarato, sugieren una mayor efectividad *in vivo* del sistema *b*).

Material y métodos

Cepas. *Citrobacter intermedius* C₃ se ha descrito previamente (2). La cepa S-3MA2 es una mutante pro⁻ de la cepa salvaje *Citrobacter intermedius* C₃ libre del factor S (3).

Medios. Las cepas se desarrollan sobre el medio M1 líquido, cuya composición en g/l es: glucosa, 20; NH₄Cl, 7; KH₂PO₄, 1; MgSO₄, 0,5; pH final, 7,2. En el medio M1 α ; la glucosa es sustituida por una mezcla de ésta, 16 g/l, y de α -cetoglutarato, 3 g/l.

Las curvas de crecimiento se obtienen por desarrollo en tubos de 25 \times 150 mm con 15 ml de medio líquido. La incubación se efectúa en un baño a 30° C con agitación (125 oscilaciones/min y 4 cm de recorrido). Las determinaciones del crecimiento se hacen por turbidez (500 nm) introduciendo el tubo de ensayo en un Coleman-Junior II (Modelo 6/20). Los inóculos (0.5 ml) se obtienen sobre M1 (30° C, 24 h).

Determinaciones de la actividad enzimática. Las cepas se han desarrollado sobre M1 sólido en frascos-Roux de 1.500 mililitros de capacidad por incubación a 30° C durante 20 h. Las células se recogen por lavado con tampón Tris-HCl 200 mM pH 8 y se centrifugan a 7.500 \times g, 4° C, 10 min. El sedimento se suspende en 4 ml del mismo tampón y se añade 0.5 g de perlas de cuarzo de 0,10-

0,11 mm de diámetro (Braun). La mezcla se somete a oscilación en un micro-desmembrador (Braun) durante 25 min 4° C 5 \times 10⁴ ciclos/s. El homogenado se centrifuga durante 15 min 4° C 17.000 \times g. El sobrenadante se utiliza sin purificación posterior.

La determinación de la actividad GD se efectúa por medición de la velocidad de oxidación del NADPH a través de los cambios de absorción a 340 nm en un espectrofotómetro Uvispek MK9 (Hilger-Watts) con cubetas de 1 cm de lado que contengan: tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8; α -cetoglutarato (Sigma) 2,5 mM; NH₄Cl (Merck) 100 mM; NADPH (Sigma) 0,1 mM; 0,4 ml del extracto enzimático y agua destilada hasta 3 ml.

Para determinar la actividad GtS se emplea la diferencia entre el NADPH oxidado en presencia y ausencia de L-glutamina (Merck) 2,5 mM en un mezcla de ensayo con idénticas características que las empleadas en la determinación de GD y suprimiendo el NH₄Cl (5).

La unidad enzimática (U.E.) se define como los μ moles de sustrato transformados por minuto. La actividad específica (A.E.) se expresa en U.E. por mg de proteína determinada por el método de Lowry *et al.* (4) a partir de una curva patrón obtenida con albúmina sérica bovina (Sigma). Se utiliza MSF (Sigma) como inhibidor específico de la reacción (b).

Resultados

En las dos cepas estudiadas se ponen de manifiesto unos niveles de GD similares (tabla I). La cepa S-3MA2 no excreta glutamato (3). Por este motivo, no parece existir una regulación de la excreción a través de la GD como es característico de otras cepas productoras de glutamato (8). Por otro lado, la uniformidad en la actividad específica de la GtS hace poco probables una regulación del fenómeno de la excreción a través de la vía GtS-GtS. La adición al medio de α -cetoglutarato esta-

blece la excreción de glutamato en las poblaciones no excretoras (6). Cuando se determina la actividad específica de GD y

Tabla I. Actividad específica GD y GtS en *Citrobacter intermedius* C₃ y S⁻ pro⁻ 3MA2. Los valores expresados representan el valor medio de seis experiencias independientes.

| | M1 | | M1 α | |
|----------------|-------|-------|-------------|-------|
| | GD | GtS | GD | GtS |
| C ₃ | 0,237 | 0,048 | 0,247 | 0,080 |
| 3MA2 | 0,230 | 0,048 | 0,262 | 0,082 |

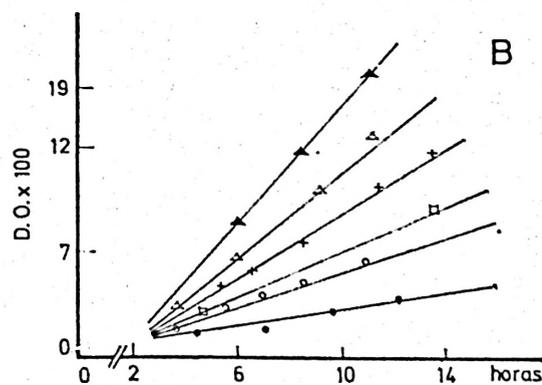
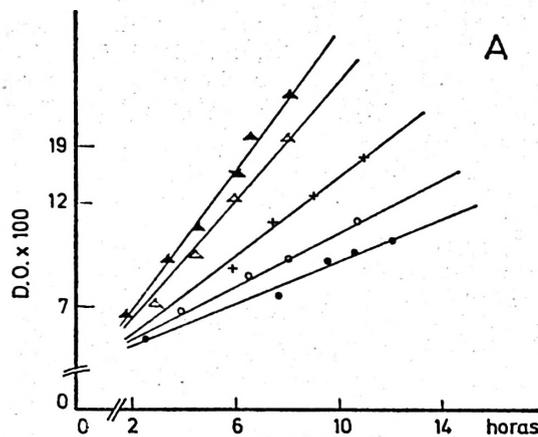


Fig. 1. Crecimiento de *Citrobacter intermedius* C₃ (A) y S⁻ pro⁻ 3MA2 (B) en el medio M1 (x); M1 sin NH₄Cl y con glutamato 75 mM (▲); M1 α + MSF 75 mM (Δ); M1 + MSF 10 mM (□); M1 + MSF 50 mM (○); M1 + MSF 75 mM (●).

GtS en las cepas que han crecido sobre M1 α , no se pone de manifiesto un aumento en la actividad específica de GD, mientras que se incrementa la actividad específica de la GtS. Consecuentemente, la excreción de glutamato en la cepa salvaje *Citrobacter intermedius* C₃ y en la mutante pro⁻ S-3MA2, podría estar en relación con la vía GnS-GtS, cuando el crecimiento tuviese lugar sobre el medio M1 α .

La adición de MSF 10, 50 ó 75 mM al medio M1 provoca una inhibición del crecimiento proporcional a la concentración del análogo (fig. 1), tanto en la cepa salvaje como en la mutante pro⁻ no segregadora de glutamato. Sin embargo, el efecto inhibitor de la MSF no se pone de manifiesto cuando el desarrollo tiene lugar en el medio M1 α , siendo mayor el desarrollo total y menor el tiempo de generación en M1 α + MSF con respecto a los mismos parámetros obtenidos en M1. En todos los casos la adición de glutamato 75 mM al medio M1, proporciona un tiempo de generación menor y un desarrollo total superior a los obtenidos en M1 y M1 α .

Discusión

En *Citrobacter intermedius* C₃ se detectan niveles importantes de GD y GtS. La inhibición del crecimiento por MSF sugiere una inhibición de la síntesis de glutamato vía GnS-GtS. La supresión de este efecto por adición al medio de α -cetoglutarato da a entender que la GD existente no es funcional a pesar de ponerse de manifiesto una actividad específica notable. El crecimiento y la síntesis de glutamato en la cepa C₃ en M1 posiblemente tiene lugar a través de la vía GnS-GtS, en vez de la vía GD, por carecer del sustrato necesario. Por otro lado, deben considerarse dos aspectos más en la supresión del efecto inhibitor de la MSF por el α -cetoglutarato: la inducción del sistema desadenilante y represión del sistema adenilante de la GnS y el aumento de la acti-

vidad específica de la GtS por adición al medio de α -cetoglutarato.

Resumen

Se pone de manifiesto actividad GD y GtS en *Citrobacter intermedius* C₃, así como en la mutante pro⁻ 3MA2 no excretora de glutamato. El crecimiento de estas cepas en el medio M1 puede inhibirse con metionín sulfona en proporción directa a las concentraciones usadas. El desarrollo sobre el medio M1 α suprime totalmente el efecto inhibitorio de la metionín sulfona, incrementa la actividad específica de la GtS y mantiene los niveles de GD. Se discute el sentido fisiológico de la inhibición del crecimiento debido a la metionín sulfona, así como el efecto supresor del α -cetoglutarato.

Bibliografía

1. BRANCHLEY, J. E.: *J. Bacteriol.*, **114**, 666-673, 1973.
2. CLOTET, R., GUINEA, J. y PARÉS, R.: *Rev. esp. Fisiol.*, **25**, 41-54, 1969.
3. JOFRE, J.: Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona, 1976.
4. LOWRY, O., ROSENBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
5. MEERS, J. L., TEOPEST, D. W. y BROWN, C. M.: *J. Gen. Microbiol.*, **64**, 187-194, 1970.
6. PARÉS, R., GUINEA, J., HERNÁNDEZ, S., VALLOIX, J. y JOFRE, J.: *J. Bacteriol.*, **119**, 9-18, 1974.
7. SHAPIRO, B. M. y STADTMAN, E. R.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **24**, 501-524, 1970.
8. VANDECASTEELE, J. P., LEMAL, J. y COUDER, J.: *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 178-180, 1975.