

R. 8266

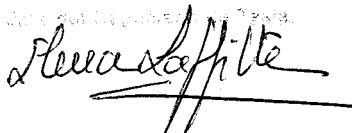
7-400

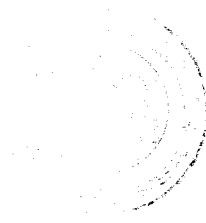
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA**

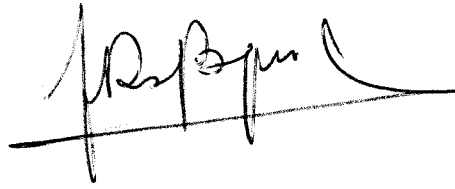
UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA  
 C/ Profesor Arce, 37 - 41013 Sevilla  
 Tel. 954 21 10 00 - 954 21 10 01  
 Fax 954 21 10 02

Director del Departamento  




**EFFECTO DE LA NARANJA DE ACRIDINA EN *Amoebobacter morrhuae*,  
*Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae*.**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
 DEPARTAMENTO DE EL DPTO. DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA  
 FACULTAD DE FARMACIA  
 Se entregó el trabajo el día 2 de Julio  
 20 de Julio de 1990  
 21 de Julio de 1990  
 DIRECTOR DEL DPTO.



Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia Dña. Maria Purificación Boloix Carlos-Roca, para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

Memoria relizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada M<sup>a</sup> PURIFICACION BOLOIX CARLOS-ROCA para optar al grado de Doctor.

Fdo: Manuel Megías Guijo

  
El Director



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, CATEDRATICO DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD  
DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICO que: la Tesis Doctoral titulada: "Efecto de la  
Naranja de Acridina en *Amoebobacter morrhuae*,  
*Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y  
*Halococcus morrhuae*", presentada por la Lda. en  
Farmacia M<sup>a</sup> PURIFICACION BOLOIX CARLOS-ROCA para  
optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el  
Departamento de Microbiología y Parasitología de  
esta Facultad bajo la dirección del Doctor D.  
Manuel Megías Guijo.

Y para que así conste, expido y firmo el presente  
certificado en Sevilla 21 de Junio de 1990.



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

MANUEL MEGIAS GUIJO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICA : Que la Tesis Doctoral titulada "Efecto de la Naranja de Acridina en *Amoebobacter morrhuae*, *Halocarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae*", presentada por la Uda. en Farmacia M<sup>a</sup> PURIFICACION BOLOIX CARLOS-ROCA para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en este Departamento bajo mi dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a 21 de Junio de 1990.

Parte de los resultados obtenidos en esta memoria, han sido presentados al X Congreso Nacional de Microbiología, celebrado en Valencia, Septiembre-Octubre 1985.

A la memoria de mi padre. A mi madre, porque su sacrificio hizo posible que esta Tesis pudiera comenzar un día.

Mi sincero agradecimiento :

Al Prof. Dr. Francisco Ruíz Berraquero, por su estímulo y apoyo incondicional en todo momento.

Al Prof. Dr. Manuel Megías Guijo, no sólo por la dirección de esta Tesis, sino también por haberme ofrecido siempre su incondicional ayuda, así como su experiencia y conocimientos a los que debo mi formación científica.

Al Prof. Dr. Miguel Angel Caviedes Formento, por su valiosa ayuda, sus consejos y su amistad en todo momento.

A Carolina Sousa, por su amistad y desinteresada ayuda en momentos difíciles, con quien he compartido muchas horas de laboratorio de las que guardo un grato recuerdo.

A Angel Cebolla, por su amistad y ayuda en la realización de las gráficas sin la cual no hubiera podido salir a la luz esta Tesis.

A Jaime, Rafael y Francisco Javier Mateo por su cariño y compañía, gracias a lo cual pude trabajar muchos días.

A Puri, Ana e Inmaculada por su colaboración en determinados momentos de este trabajo.

A Juan Manuel, Manolo Castro y en general a todos los compañeros, que de una u otra forma han colaborado en la realización de este trabajo.

**INDICE**



	Pag.
INTRODUCCION .....	1
1. Ambientes salinos .....	2
2. Arqueobacterias .....	7
3. Halobacterias .....	15
3.1. Generalidades .....	15
3.2. Requerimientos nutricionales .....	17
3.3. Situación taxonómica .....	18
3.4. Contenido en lípidos de las halobacterias .....	24
3.5. Pared celular .....	26
3.6. Otros componentes .....	28
3.7. Interés de las halobacterias .....	31
3.8. Genética de halobacterias .....	33
4. Las acridinas .....	42
4.1. Estructura .....	43
4.2. Usos medicinales y comerciales .....	44
4.3. Interacción con los ácidos nucleicos .....	46
4.4. Mutagenicidad de las acridinas .....	47
4.5. Mecanismo mutacional .....	50
4.6. Acción fotodinámica .....	50
4.7. Efectos biológicos .....	52
OBJETIVO DEL TRABAJO .....	55
MATERIALES Y METODOS .....	59
Materiales .....	60
1. Microorganismos .....	60
2. Productos químicos .....	61
2.1. Naranja de Acridina .....	61

2.2. Reactivo de la glucosa enzimática .....	61
2.3. Compuestos nitrogenados .....	61
2.4. Carbohidratos .....	62
2.5. Alcoholes .....	63
2.6. Acidos orgánicos .....	64
2.7. Antibióticos .....	65
2.8. Metales pesados .....	65
3. Medios de cultivo .....	66
3.1. Cultivo y mantenimiento de las cepas .....	66
3.2. Medio base para el estudio de la utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos ....	68
3.3. Medio base para la movilidad .....	68
3.4. Medio base para compuestos nitrogenados .....	69
3.5. Medio base para antibióticos, metales pesados y estudios con Naranja de Acridina .....	69
3.6. Medio para el estudio de la producción de polisacárido .....	69
3.7. Medio para el estudio de la formación del velo superficial .....	70
3.8. Medio utilizado en el estudio del crecimiento de microorganismos en presencia de Naranja de Acridina a distintos pHs .....	70
3.9. Medio para el estudio del efecto de los fosfatos en la viabilidad de los microorganismos en presencia de Naranja de Acridina .....	70
3.10. Medio mínimo .....	71
4. Tampones .....	72

4.1. Tampón tris-maleato modificado .....	73
4.2. Tampón de electroforesis .....	73
Metodos.....	74
<b>1. Estudio de la viabilidad de los microorganismos</b>	
en medio líquido con distintas concentraciones	
de Naranja de Acridina .....	74
2. Estudio del crecimiento de los microorganismos a	
distintas temperaturas en presencia de Naranja	
de Acridina .....	74
3. Estudio del crecimiento de los microorganismos	
en medio sólido con Naranja de Acridina .....	75
4. Obtención de microorganismos resistentes a la	
Naranja de Acridina .....	75
5. Estudio del efecto de la concentración de sales	
en la supervivencia con Naranja de Acridina .....	76
6. Estudio de la influencia del fosfato monopotásico	
y dipotásico en la viabilidad de los microorga-	
nismos tratados con Naranja de Acridina .....	76
7. Estudio para determinar si la glucosa influye	
en la viabilidad de los microorganismos en	
presencia de Naranja de Acridina .....	77
8. Estudio del consumo de Naranja de Acridina por	
los microorganismos .....	78
9. Estudio de la viabilidad de los microorganismos	
cultivados con Naranja de Acridina a diferentes	
pHs .....	79
10. Estudio al microscopio de contraste de fase de	

los microorganismos crecidos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	80
11. Estudio de la movilidad de los microorganismos en placa en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	80
12. Estudio del polisacárido extracelular de los microorganismos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	81
13. Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.	82
14. Utilización de compuestos nitrogenados com única fuente de carbono nitrógeno y energía .....	83
15. Estudio de la formación de velo superficial en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	83
16. Estudio del comportamiento de los microorganismos frente a los antibióticos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	84
17. Estudio del comportamiento de los microorganismos frente a metales pesados en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	85
18. Análisis del perfil de plásmidos .....	85
19. Obtención de mutantes auxotróficos por tratamien- to con Naranja de Acridina .....	86
RESULTADOS Y DISCUSION .....	87
1. Crecimiento de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H.</i> <i>halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> en presencia y ausencia de Naranja de Acridina .....	88

2. Influencia de la temperatura en el efecto de la Naranja de Acridina sobre el crecimiento de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	100
3. Influencia de las fases de crecimiento del cultivo en el efecto de la Naranja de Acridina sobre <i>A. morrhuae</i> , <i>H. halobium</i> , <i>H. californiae</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	110
4. Influencia del pH en el efecto de la Naranja de Acridina sobre el crecimiento de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	120
5. Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> con distintas concentraciones de sales.....	123
6. Influencia del fosfato en el crecimiento y supervivencia a la Naranja de Acridina de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	133
7. Influencia de la concentración de glucosa sobre el efecto de la Naranja de Acridina en cultivos de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	143
8. Estudio del consumo de Naranja de Acridina en cultivos de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	170
9. Utilización de la Naranja de Acridina como agente mutagénico .....	173

9.1. Búsqueda de mutantes auxotróficos .....	173
9.2. Movilidad bacteriana .....	174
9.3. Utilización de carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados como única fuente de carbono y energía .....	174
9.3.1. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía .....	175
9.3.2. Utilización de alcoholes como única fuente de carbono y energía .....	180
9.3.3. Utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía .	180
9.3.4. Utilización de los ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía .....	185
9. 4. Influencia de la Naranja de Acridina en la resistencia a antibióticos y metales pesados de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	190
10. Influencia de la Naranja de Acridina en la formación de velo superficial de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	200
11. Estudio de la producción y análisis de polisacáridos de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> en presencia de Naranja de Acridina .....	201
12. Estudio microscópico de la influencia de la Naranja de acridina en la morfología celular y movilidad de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> ,	

H. halobium y H. morrhuae .....	215
13. Estudio de la pérdida de plásmidos de <i>A. morrhuae</i> , <i>H. californiae</i> , <i>H. halobium</i> y <i>H. morrhuae</i> .....	221
CONCLUSIONES .....	223
BIBLIOGRAFIA .....	228

## **INTRODUCCION**



## 1. Ambientes salinos

La mayor cantidad de agua sobre la tierra corresponde al agua del mar, que lleva en solución sales inorgánicas en concentraciones constantes.

Las aguas hipersalinas se definen como aquellas que poseen mayor concentración de sales que el agua del mar, definición un tanto inespecífica, ya que no hay restricciones en cuanto a los tipos de sales inorgánicas y sus proporciones (Rodríguez-Valera, 1988). Sin embargo, la gran mayoría del agua salada sí tiene la composición del agua del mar y se denomina talasosalina. Aquellas otras aguas hipersalinas cuya composición no guarda la misma relación que las del mar reciben el nombre de atalasalinas.

Las bacterias halófilas extremas crecen bien en el valor (0.75 aw) de una solución saturada de ClNa (Brown, 1976). La fisiología de estas bacterias por tanto está influida por una absoluta necesidad de concentraciones elevadas de NaCl aunque toleren otras sales a concentraciones moderadas tales como Ca<sub>2</sub>Cl (Brown, 1976). Por lo tanto su habitat natural son salinas solares y lagos salados naturales (Kushner, 1980).

Desde la antigüedad, se ha observado en las salinas una especie de costra rojiza, y el agua en sus inmediaciones también toma esa coloración más o menos rojo-anaranjada. Esto es debido a la gran concentración de bacterias halófilas,

normalmente pigmentadas por la presencia de pigmentos carotenoides (Baas-Becking, 1931). Estas coloraciones a su vez pueden observarse en productos en salazón y en grandes lagos (Larsen, 1986).

En las costas bajas de lugares templados como pueden ser las mediterráneas y las costas de California, abundan las salinas en las que además de su elevada concentración de sal, podemos destacar sus fuertes oscilaciones de temperatura entre el día y la noche, así como un bajo contenido en oxígeno debido a que su solubilidad en estos medios tan concentrados, es bastante mala (Rodríguez-Valera y Ruíz-Berraquero, 1983).

La evaporación a su vez, además de concentrar las sales, concentra también los solutos, proporcionando a los organismos halófilos un medio bastante rico en nutrientes orgánicos e inorgánicos (Brown, 1976).

Cuando el total de sales disueltas se aproxima a la saturación, se crea un microclímax que constituye la población microbiana dominante de estos sistemas hipersalinos: halobacterias, eucariotas y eubacterias (Imhoff y col., 1979; Nissenbam, 1975; Rodríguez-Valera, 1986).

No todos los habitats hipersalinos se originan a partir del agua del mar, existiendo también los llamados lagos salados cuya formación es debida a depósitos minerales en proporción de sal que a veces varía mucho de la del medio marino (Rodríguez-Valera y Ruíz-Berraquero, 1983). Los lagos salados por lo tanto, pueden diferenciarse mucho unos de

otros dependiendo de su composición iónica, topografía y características geológicas, así como de sus condiciones climáticas habituales (Grant y Ross, 1986).

Se ha de tener en cuenta, que no son únicamente halófilas extremas las halobacterias, ya que también se incluyen otros microorganismos muy diferentes como pueden ser bacterias fotosintéticas del género *Ectothiorhodospira* (Raymon y Sistrion, 1969; Imhoff y Trüper, 1977), actinomicetos como *Actinolyspora halophila* (Gochnauer y col., 1975) y posiblemente metanógenos (Perez-Fillol y col., 1985).

Es difícil establecer una clasificación de microorganismos en función del crecimiento a distintas concentraciones de sales (Larsen, 1962; Imgram, 1977; Kushner, 1978), ya que existen casos intermedios difíciles de encuadrar. Además, se ha comprobado que hay muchos microorganismos cuya respuesta a la sal varía en relación a las condiciones ambientales, como por ejemplo, *Vibrio costicola* que necesita una concentración óptima de NaCl de 0,5M para crecer a 30°C, mientras que a 20°C sólo necesita 0,2M de NaCl (Kushner, 1978).

Por lo tanto, según la temperatura de crecimiento, algunos microorganismos halófilos moderados pueden crecer en altas o bajas concentraciones de sal (Larse, 1973; Matheson y col., 1976).

Igualmente en halobacterias extremas, la composición y concentración de sales del medio influye sobre la temperatura óptima de crecimiento y viceversa, como demostraron Gibbons y

Payne (1961) al observar que un aumento en la concentración de NaCl provocaba un aumento de la temperatura óptima de crecimiento de *H. salinarium* y que por otro lado, los requerimientos de sales de las halobacterias pueden aumentar con la temperatura (Norvitsky y Kushner, 1975; Mullkhanbhai y Larsen, 1975).

Por otro lado, se ha observado que dependiendo de la complejidad de nutrientes del medio, algunos halófilos moderados varían su grado de halofilismo (Fosyth y Kushner, 1970).

Las halobacterias necesitan altas concentraciones de NaCl para que crezcan en condiciones óptimas, aunque algunas veces el  $K^+$  puede reemplazar parcialmente al  $Na^+$  (Brown y Gibbons, 1985).

Debido a todo esto, y a los diversos criterios existentes para clasificar a los organismos halófilos extremos, Gibbons (1974), basándose en los límites superior e inferior de la concentración de sal que permiten el crecimiento bacteriano, definió a los microorganismos halófilos como aquellos que necesitan más del 3% de NaCl para crecer, llamando halófilos moderados a los que crecen en un rango del 3 al 15% y halófilos extremos a los que crecen en medios con concentraciones superiores al 15% de NaCl.

Posteriormente Kushner (1985) y Kushner y Kamekura (1988), clasificaron a los microorganismos en 6 grupos según la concentración salina óptima requerida para su crecimiento.

1º) NO HALOFILOS, crecen mejor en medios con una concentración inferior 0,2M de sal (1%), encontrándose aquí la mayoría de las eubacterias y microorganismos de agua dulce.

2º) HALOFIOS DEBILES, con un rango óptimo de crecimiento entre 0,2-0,5M de sal (1-3%), incluyendo a la mayoría de los microorganismos marinos.

3º) HALOFILOS MODERADOS, con crecimiento óptimo en concentraciones de sal entre 0,5-2,5M (3-15%), incluyendo aquí bacterias como *Vibrio costicola* y arqueobacterias metanógenas tales como *Methanohalophilus mahaii* (Paterek y Smith, 1988), *Methanophilus zhilinae* (Mathrani y col., 1988) y *Methanococcus doii* (Yu y Kawamura, 1987).

4º) HALOFILOS EXTREMOS DEBILES, entre los que incluye microorganismos que presentan un crecimiento óptimo en concentraciones entre 1,5-4,0M de sal (9-23%) encontrándose un reducido número de microorganismos tales como *Ectothiorhodospira halophila*, *Actinopolyspora halophila*, *Haloferax volcanii* y *Haloferax mediterranei*.

5º) HALOFILOS EXTREMOS, con crecimiento óptimo entre 2,5-5,2M de sal (15-30%), incluyendo las halobacterias y algunos metanógenos como *Methanohalobium evestigatus* (Zhilina y Zavarzim, 1987).

6º) HALOTOLERANTES, microorganismos no halófilos que toleran la sal en los que se incluye a *Staphylococcus aureus*, bacterias esporuladas, algunas levaduras, algas y hongos.

## 2. Arqueobacterias

Woese y Fox en 1977, estudiando las secuencias del ARNr 16S de diferentes especies bacterianas, descubrieron que había un grupo de bacterias, las metanógenas, que estaban relacionadas por igual con los eucariotas y con las eubacterias, proponiendo que, en vez de los dos reinos conocidos hasta entonces en la Naturaleza, procariotas y eucariotas, fueran tres las líneas de descendencia: eubacterias (o bacterias verdaderas), arqueobacterias y eucariotas (Wolfe, 1971 y 1979; Fox y col., 1977).

En 1978, Magrum y col. incorporaron en las arqueobacterias las halófilas extremas *Halobacterium* y *Halococcus* y Woese y col. a las termoacidófilas *Sulfolobus* y *Thermoplasma*, quedando por lo tanto constituidas las arqueobacterias por estos tres grupos de bacterias muy diferentes entre sí, con la propiedad común de vivir en ambientes extremos propios en los primeros estadios de la formación de nuestro planeta (Kandler, 1984).

Esta teoría filogenética de clasificación actualmente se encuentra en debate, ya que Lake (1989), propone una nueva clasificación, en procariotas y cariotas.

Los procariotas incluirían eubacterias, halobacterias y metanógenos; los cariotas incluirían a los eucariotas y los eocitos, incluyendo en estos a los termoacidófilos (Lake, 1986). Esta teoría se basa en la estructura de los ribosomas, ya que en los primeros trabajos de Lake y col. (1984) se

apreció una relación filogenética entre la estructura de las subunidades mayor y menor de los ribosomas de eucariotas y eocitos por un lado y por otra parte, entre las mismas subunidades de eubacterias , halobacterias y metanógenos.

Lake (1988) afirma que la estructura filogenética actualmente aceptada se ha obtenido debido a errores sistemáticos en los métodos habituales de análisis. Olsen y Woese (1989) no creen demostrado que los análisis habituales produzcan los errores aludidos por Lake (1988).

Por otro lado el modelo propuesto por Lake está en contradicción con el de la evolución de la ARN polimerasa dependiente de ADN (Zilling y col., 1989), y el obtenido utilizando inhibidores de la síntesis de proteínas (Oliver y col., 1987).

Actualmente las arqueobacterias comprenden cinco grupos de microorganismos muy diversos (König y Stetter, 1989a).

Grupo I. METANOGENOS: bacterias capaces de formar metano como principal producto final de su metabolismo. Formiato, acetato, metanol o metilaminas, pueden servir como sustratos. El azufre elemental puede ser reducido a  $H_2S$  sin ganancia de energía. Son anaerobios estrictos. Muestran una fluorescencia verde-azulada a 420 nm. Las células poseen coenzima M, factor 430 y metanopterina.

Los metanógenos se encuentran divididos en tres Ordenes: Methanobacteriales, Methanomicrobiales y Methanococcales (Balch y col., 1979; Whitman, 1985).

Además se han descrito representantes de la Familia

Methanoplanaceae y del género *Methanosphaera* sin haber sido incluidos en ninguno de los anteriores grupos (Boone y Mah, 1989).

Grupo II. ARQUEOBACTERIAS REDUCTORAS DE SULFATO, que son capaces de formar H<sub>2</sub>S mediante reducción de sulfato, formando además trazas de metano. Son termófilos extremos (crecimiento hasta 92°C). Son anerobios estrictos. Dan lugar a una fluorescencia verde-zulada a 420 nm. Poseen factor 420 y metanopterinina pero no coenzima M ni factor 430. Incluye el género *Archaeoglobus* (Stetter, 1989).

Grupo III. ARQUEOBACTERIAS HALOFILAS EXTREMAS. Son Gram negativas o Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas quimioorganotrofas. Incluye cocos, bacilos o formas más o menos irregulares. Requieren para crecer altas concentraciones de NaCl (1,5M o mayor). Algunas son alcalófilas, mesófilas o ligeramente termófilas (hasta 55°C). Algunas especies contienen bacteriorrodopsina y son capaces de utilizar la luz para la síntesis de ATP.

Grupo IV. ARQUEOBACTERIAS SIN PARED CELULAR. Son formas cocoides termoacidófilas sin pared celular. La membrana citoplasmática contiene una glucoproteína rica en manosa y un lipoglucano. Aerobios. Incluye el género *Thermoplasma* (Langworthy y Smith, 1989).

Grupo V. TERMOFILOS EXTREMOS METABOLIZADORES DE AZUFRE ELEMENTAL. Son termófilos aerobios obligados, aerobios facultativos o estrictamente anaerobios. Presentan una



temperatura óptima de crecimiento entre 70 y 105°C. Son acidófilos o neutrófilos. La mayoría de las especies son metabolizadoras de azufre. Se encuentran divididos en tres Ordenes: Thermococcales, Thermoproteales y Sulfolobales (König y Stetter, 1989b).

La mayoría de las arqueobacterias poseen sólo una capa de subunidades protéicas o glucoprotéicas ordenadas regularmente (Kandler, 1982 y 1984). Esta diversidad de la pared celular de las arqueobacterias parece indicar una separación de las otras dos ramas evolutivas en los primeros estadios de su evolución (Woese y Fox, 1977; Fox y col., 1980).

La membrana celular de las arqueobacterias está formada por lípidos no habituales lo que le da quizás el aspecto más constante y característico a este grupo de microorganismos, siendo útiles como marcadores químicos para la identificación y diferenciación de arqueobacterias (Langworthy y Pond, 1986).

Los lípidos de eucariotas y eubacterias, están principalmente constituidos por dos ácidos grasos de cadena recta, ligados por un extremo a una molécula de glicerol con enlaces tipo éster (-CO-O-). Los lípidos de las arqueobacterias por el contrario se caracterizan por ser cadenas largas hidrocarbурadas, pero la conexión entre el glicerol y las cadenas es un enlace de tipo éter (-O-) no éster, y además las cadenas están ramificadas, cada cuatro átomos de carbono de la cadena hay un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>).

Por otra parte, el carbono 1 del glicerol puede estar sustituido por fosfato o varios sacáridos, y la actividad óptica del carbono central del glicerol es opuesta en arqueobacterias a la que posee en los otros dos reinos primarios (Langworthy, 1985), marcando la pauta de las importantes diferencias en la construcción de la membrana citoplasmática de las arqueobacterias.

Otra gran diferencia, surgió al estudiar el ribosoma arqueobacteriano y analizar sus componentes, proteínas y ARN (Bayley y Kushner, 1964; Matheson y Yaguchi, 1982), observándose que filogenéticamente constituían un grupo aparte distinto tanto de eubacterias como de eucariotas (Fox y col., 1980).

Aunque los ribosomas de los tres reinos eran muy parecidos en tamaño y composición, las arqueobacterias difieren en la estructura tridimensional y la naturaleza de las proteínas. Se ha comprobado que los ribosomas de las arqueobacterias contienen más proteínas que los de las eubacterias y menos que los de las eucariotas, y que además, estas proteínas de los ribosomas arqueobacterianos son predominantemente ácidas (Bayley, 1966).

Los datos que se tienen sobre los ARNt de las arqueobacterias no son suficientes para dar información categórica, pero ateniéndonos a los estudios de secuenciación de ARNt de *Halobacterium volcanii* (Gupta, 1981; Gupta y col., 1983), *H. cutirubrum* (Gu y col., 1983) *Halococcus morrhuae*, *Thermoplasma acidophilus* y *Sulfolobus acidocaldarius*

(Kuchino y col., 1982), se puede indicar que si en su organización básica son similares a los que presentan los ARNt de los otros dos reinos, viendo los detalles específicos se observa que son muy diferentes de los otros dos grupos, tanto como las diferencias que existen entre los ARNt de eucariotas y procariotas.

Por lo tanto, basándose en las características generales de los ARNt, deberían agruparse en tres categorías filogenéticas: eubacterias, arqueobacterias y eucariotas (Gupta, 1985).

En el transcurso de los estudios sobre el ARN ribosómico surgió otra inesperada propiedad arqueobacteriana, que vino a ofrecer la primera clave del significado de las diferencias entre arqueobacterias y las bacterias verdaderas. Si se comparan los ARNr y ARNt en los eucariotas, eubacterias y arqueobacterias, se observa un patrón general. En las tres líneas primarias de descendencia tienden a ser modificadas las mismas regiones de ARN, pero la naturaleza de la modificación varía de un reino a otro. La diferencia es de dos clases, o bien la modificación de una determinada base es diferente en cada uno de los reinos, o bien se modifica en un reino una base determinada y en otro reino la modificación se realiza en una base adyacente. Tales formas de variaciones sugieren que las modificaciones han evolucionado por separado en cada una de las tres líneas de descendencia, a partir de un antepasado común (Woese, 1981).

Por el contrario, las ARN polimerasas dependientes de

ADN de arqueobacterias, difieren de las eubacterias y se asemejan a las ARN polimerasas de eucariotas sobre todo a las de las levaduras, demostrándose que, al igual que éstas, son estimuladas por el alcaloide sibilina (Zillig y col., 1982). Del mismo modo Madon y col. (1983), comprobaron que la actividad de la ARN polimerasa dependiente de ADN de arqueobacterias está fuertemente estimulada por glicerol y dimetilsulfóxido, y que son insensibles a rifampicina, estreptolidigina y -amanitina (Zillig y col., 1985).

En general en la Tabla I, se muestran las diferencias más significativas entre los tres reinos.

**Tabla I. Diferencias y semejanzas entre eubacterias arqueobacterias y eucariotas (Kusner, 1985)**

ESTRUCTURA	EUBACTERIA	ARQUEOBACTERIA	EUCARIOTA
<b>Membrana nuclear</b>	carecen	carecen	poseen
<b>Pared celular</b>	mureína	diversos tipos	diversos tipos
<b>Lípidos</b>	ac. grasos éster	fitanil éter	ac. grasos éster
<b>Ribosomas</b>			
Tamaño de las subunidades	30S, 50S	30S, 50S	40S, 60S
Longitud aprox. del ARN 16S (18S)	1.500 nucleótidos	1.500 nucleótidos	1.800 nucleótidos
<b>Organización genética</b>			
Exones e intrones	carecen	poseen	poseen
Secuencias repetidas	carecen	poseen	poseen
Reordenaciones cromosómicas crecientes	carecen	poseen	poseen
<b>Estrategia ecológica</b>			
Metabolismo	diverso	diverso	poco variado
Ambientes	todo tipo	extremos	todo tipo
Soluto compatible	betaína	K <sup>+</sup>	polioles

### 3. Halobacterias.

#### 3.1. Generalidades.

Las bacterias halófilas extremas se han aislado de pescados en salazón, diversos estanques salinos y del Mar Muerto (Bayley y Morton, 1978; Javor y col., 1982). De acuerdo con la morfología pueden distinguirse bacilos, cocos, halobacterias "cuadradas" y especies pleomórficas, que son filogenéticamente distintas como se indican por experimentos de hibridación del ADN (Kushner, 1985; Ross y Grant, 1985; Ebert y Goebel, 1985).

La mayoría de los estudios genéticos con halobacterias se hicieron en la especie pleomórfica aislada del Mar Muerto *H. volcani*. Las halobacterias bacilares incluyen *H. halobium*, especies relacionadas *H. cutirubrum* y *H. salinarium* y algunas especies independientes aisladas de la Bahía de San Francisco, Baja California, Francia y el Mar Rojo (Moore y McCarthy, 1969; Ebert y col., 1984). Todas ellas tienen forma bacilar sólo bajo condiciones óptimas de crecimiento, en medios de cultivo conteniendo 4M de NaCl. En cultivos viejos, presumiblemente bajo condiciones extremas, tales como altas concentraciones de sal o agotamiento de nutrientes, desarrollan formas parecidas a palos de golf y subsecuentemente apariencia pleomórfica (Matheson y col., 1976; Ebert y col., 1985).

La mayoría de las especies presentan un fenotipo común,

el formar colonias con pigmentación rojiza debido a la síntesis de bacterioruberina. Además las especies bacilares, contienen una única proteína, la bacteriorodopsina, que da color púrpura a la membrana bajo condiciones limitadas de oxígeno (Blaurock y Stoeckenius, 1971). Los halococos, las bacterias cuadradas y *H. volcani*, no producen membrana purpúrea (Pfeifer, 1988).

Algunas halobacterias sintetizan vacuolas de gas, que son estructuras proteínicas englobando un espacio relleno de gas (Larsen y col., 1967; Krantz y Ballon, 1973). Estas vesículas cilíndricas o alargadas, son visibles fácilmente al microscopio óptico (Stoeckenius y Kunan, 1968; Parkes y Walsby, 1981).

El ADN de las bacterias bacilares, pleomórficas y cuadradas puede extraerse lisando las células en soluciones de sal con concentraciones inferiores a 1M de NaCl, y añadiendo desoxicolato sódico a una concentración de 7mM. Los cocos requieren procedimientos muy severos tales como la prensa francesa o la pulverización de las células con alúmina (Maddon y col., 1983; Leffers y Garret, 1984). Recientemente Montero (1990) ha descrito un procedimiento para la lisis de los cocos basado en la adición de glicina y lisando las células en agua destilada con Sarcosil.

El análisis total del ADN de diferentes halobacterias, revela un promedio del contenido en guanina más citosina (G+C) mayor del 60% y además, en la mayoría de los casos, el ADN total puede ser separado en dos fracciones (FI y FII), de

acuerdo con el contenido en (G+C) (Joshi y col., 1963; Moore y McCarthy, 1969; Pfeifer y col., 1982; Ross y Grant, 1985). La fracción FI del ADN está constituida por secuencias cromosómicas de 62 a 71% de (G+C). La fracción FII del ADN, más rica en adenina más timina (A+T) (55 a 58% de G+C), consiste principalmente en ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) (Weindinger y col., 1979; Ebert y col., 1984).

### 3.2. Requerimientos nutricionales.

Al realizar los primeros trabajos sobre nutrición en halobacterias con *H. cutirubrum*, *H. salinarium*, y *H. halobium* se observó que necesitaban grandes requerimientos nutritivos, utilizando como fuente de energía sólo aminoácidos, algunos de los cuales se han descrito como esenciales para el crecimiento (Onishi y col., 1965). Por ello los medios de cultivo utilizados eran complejos (Dundas y col., 1963; Onishi y col., 1965) y ricos en aminoácidos.

Posteriormente se observó que *H. cutirubrum* (Grey y Fitt, 1976), crecía mejor utilizando solo L-aminoácidos, por lo que se pensó que ciertos D-aminoácidos podrían inhibir el crecimiento. También se observó que las vitaminas no estimulaban el crecimiento (Katzneelson y Loch-Head, 1952; Onihsi y col., 1965). A su vez se pensó que las halobacterias no utilizaban los carbohidratos ya que no producían ácidos a partir de la glucosa.

Goechnauer y Kushner (1969) demostraron que el



crecimiento de *H. halobium*, *H. cutirubrum* y *H. salinarium*, era estimulado por el glicerol, glucosa y galactosa y ciertas vitaminas, indicando que si bien los carbohidratos podían estimular el crecimiento, el medio no llegaba a ser ácido, lo que quizás fuera debido a que estos microorganismos no utilizaban los carbohidratos.

Posteriormente se aislaron especies de *Halobacterium* que sí utilizaban carbohidratos como fuente de carbono y energía.

Kocur y Hodgkiss (1973) habían descubierto que el género *Halococcus* no podía crecer a expensas de carbohidratos. Sin embargo, Javor (1984), aisló tres cepas de este género comprobando que podían crecer en un amplio rango de sustratos.

### 3.3. Situación taxonómica.

Mediante el estudio de las peculiares características morfológicas de estos microorganismos, en la 8ª edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974), se encuadraron en la parte VII como bacilos y cocos Gram negativos que requieren altas concentraciones de NaCl para el crecimiento, formando la familia Halobacteriaceae que comprendía los géneros *Halobacterium* y *Halococcus*. En el género *Halobacterium* se incluyeron las especies *H. salinarium* y *H. halobium* así como las especies de situación incierta *H. marismortui*, *H. trapanicum* y *Amoebobacter morrhuae*. Este último microorganismo, aislado del bacalao salado, fue denominado como *Amoebobacter* por su extraordinario pleomorfismo

observado en la mayoría de los primeros trabajos con halófilas, suponiendo que esto era debido en cierto modo a las condiciones de crecimiento utilizadas. Sin embargo, Larsen indica que este organismo nunca toma una forma bacilar regular como resultado de las variaciones nutricionales y condiciones físicas de crecimiento, encuadrándose en el género *Halobacterium* como una especie aparte a la espera de posteriores estudios.

En el género *Halococcus* se incluyó una sola especie, *H. morrhuae*.

*H. salinarium* y *H. halobium* se consideraban como una sola especie y posteriormente Fox y col. (1980), indican que las especies *H. salinarium*, *H. cutirubrum* y *H. halobium* contienen idénticos oligonucleótidos catalogados por su ARNr 16S por lo que opinan son una misma especie. Así mismo, *Amoebobacter morrhuae*, que tiene un ARN 16S que difiere de los anteriores por un solo cambio de base, lo consideran también perteneciente a la misma especie que las otras tres halobacterias.

En el género *Halococcus* se incluyó una sola especie, *H. morrhuae*.

En la 1ª edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology en el Vol I Sección IV (Larsen, 1984) se agrupa a las halobacterias en la familia Halobacteriaceae con los géneros *Halobacterium* y *Halococcus*. En el género *Halobacterium* se encuentran las especies *H. salinarium*, (especie tipo) (Harrison y Kenedy, 1922; Elazari-Volcani,

1957) *H. volcanii*, (Mullakhanbhai y Larsen, 1975), *H. saccharovorum*, (Tomlinson y Hochstein, 1976), *H. vallismortis* (González y col., 1978) y *H. pharaonis* (Soliman y Trüper, 1982). En este género, también se incluye una especie de situación incierta *H. trapanicum*, que parece tener muchas características en común con *H. vallismortis*.

En el género *Halococcus* (Schoop, 1935), se sigue reconociendo como única especie *Halococcus morrhuae*, (Kocur y Hodgkiss, 1973).

Posteriormente se han aislado nuevas especies de halófilas extremas, que se han agregado a las ya existentes, creándose incluso nuevos géneros, los cuales han sido incluidos en la lista de especies válidas (Skerman y col., 1980; Moore y col., 1985; Moore, 1986). Tales como: *Halobacterium sodomense* (Oren, 1983) aislada del Mar Muerto, que se caracteriza por su elevado requerimiento en  $Mg^{++}$ , *Haloferax mediterranei* (Rodríguez-Valera y col., 1983), aislada en las salinas de Santa Pola, Alicante (España) que se caracteriza por su crecimiento rápido, gran versatilidad nutricional y capacidad de hidrolizar la gelatina, caseína y almidón.

Walsby (1980), aisló y describió un nuevo tipo de bacterias con morfología "cuadrangular" que contenían vacuolas de gas, a las que junto con las aisladas por Javor y col. (1982) de morfología similar, incluyen en un nuevo género: *Haloarcula*, con las especies *H. californiae* y *H. sinaiensis* (Walsby, 1980; Stoeckenius, 1981; Javor y col.,

1982).

Por otro lado Tindall y col., (1984) aislaron del lago salado Magadi en Kenia, especies de halobacterias alcalofílicas, incluyendo bacilos y cocos para los que propusieron los nombres genéricos de *Natronobacterium* para los bacilos, incluyendo las especies *N. pharaonis* (antiguamente *H. pharaonis*, Soliman y Trüper, 1982), *N. gregoriyi* y *N. magadii* y *Natronococcus* para los cocos, con la especie *N. occultus*.

Torreblanca y col. (1986), basándose en estudios de taxonomía numérica, quimiotaxonómicos y análisis genotípicos realizados por Ross y Grant (1985), propusieron la clasificación de las halobacterias no alcalófilas en tres géneros: *Halobacterium*, *Haloarcula* y *Haloferax*.

Dentro del género *Halobacterium* se incluyeron las especies *H. salinarium*, *H. saccharovorum* y *H. sodomense*.

En el género *Haloarcula*, se incluyeron *H. vallismortis* (anteriormente *Halobacterium vallismortis*) y la nueva especie *H. hispanica* (Juez y col., 1986).

En el género *Haloferax* se incluyeron *H. volcanii*, *H. mediterranei* (antiguamente *Halobacterium volcanii* y *Halobacterium mediterranei* respectivamente), y la nueva especie *H. gibbonsi* (Juez y col., 1986).

Tomlinson y col. (1986), aislaron una nueva especie a partir de una salina solar de San Francisco proponiendo su inclusión en el género *Halobacterium* como *H. denitrificans*. Tindall y col. (1989) han incluido esta especie en el género

*Haloferax* como *H. denitrificans*.

Franzmann y col. (1989), han descrito recientemente una nueva especie, *Halobacterium lacusprofundi* aislada del Océano Antártico, capaz de crecer a 4°C, aunque más lentamente que a 31-37°C.

En la 8ª edición del Manual de Bergey (Gibbons, 1974), aparecía *Halobacterium marismortui* como una especie de situación incierta, eliminándose posteriormente del volumen I de la 1ª Edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Larsen, 1984). Actualmente se incluye como especie de situación incierta dentro del género *Haloarcula* (Grant y Larsen, 1986b).

Torreblanca y col. (1986a) también incluyen en el género *Haloarcula* a *A. morrhuae*, considerado en la 8ª edición del Manual de Bergey como especie de situación incierta. Ambos microorganismos tienen diferencias totales en los patrones de los lípidos polares y no muestran una homología significativa ADN/ARNr 16S con *Haloarcula vallismortis*.

Otra especie de situación incierta incluida actualmente en el género *Halobacterium* es *H. trapanicum* que parece estar relacionada con *H. saccharovorum* y *H. sodomense* (Rosy Grant, 1985; Larsen y Grant, 1989).

También es preocupante la posición de las dos especies pleomórficas aisladas por Javor y col. (1982), "*Haloarcula californiae*" y "*Haloarcula sinaiensis*" ya que los estudios de taxonomía numérica no son consecuentes con sus especies afines, como muestran por estudios quimiotaxonómicos tales

como análisis de lípidos polares (Torreblanca y col., 1986; Ross y Grant, resultados no publicados), y comparación de oligonucleótidos catalogados por ARNr 5S (Nicholson y Fox, 1983).

*A. morrhuae* no fue agrupado con ningún otro microorganismo en el estudio de taxonomía numérica realizado por Torreblanca y col. (1986a). El patrón de lípidos polares es inusual y los estudios de hibridación ADN/ARNr 16S, no indican relación estrecha con otras halobacterias incluidas en el estudio. Sin embargo, los oligonucleótidos catalogados del ARNr 16S muestran sólo una base diferente de *H. salinarium* (Fox y col., 1980).

Grant y Larsen (1980a), lo han incluido dentro del género *Haloarcula*.

Actualmente en el Vol III del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Grant y Larsen (1989), encuadran en el grupo III en Arqueobacterias Halófilas Extremas, Orden Halobacteriales, Familia Halobacteriaceae, a todas las halobacterias basándose en los análisis de lípidos y estudios de hibridación ADN/ARNr 16S realizados por Ross y Grant (1986).

La familia Halobacteriaceae agrupa a los siguientes géneros: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Natronobacterium* y *Natronococcus* (Grant y Larsen 1989a).

### 3.4. Contenido en lípidos de las halobacterias.

Los lípidos de halobacterias (Sehgal y col., 1962; Kate,

1972 y 1978), están constituidos por lípidos polares y no polares, siendo los primeros el 90% de los lípidos totales. Por síntesis química fué establecida su estructura en cuatro grupos (Kates, 1978): I.- fosfatidilglicerolfosfato, (PGP); II.- fosfatidilglicerol(PG); III.- fosfatidilglicerolsulfato (PGS) y IV.- triglucosil dieter sulfatado.

Más recientemente, Smallbone y Kates (1981), determinaron en *H. cutirubrum* la estructura de tres glucolípidos secundarios: V.- tetraglucosil dieter sulfatado (S-TeGD), VI.- su producto disulfatado (TeGD) y VII.- TGD-1 el producto disulfatado de S-TGD-1.

La mayoría de las bacterias halófilas extremas contienen una variedad de glucolípidos cuya distribución puede utilizarse para delimitar varios grupos (Kushwaha y col., 1982, Ross y Grant, 1985).

El contenido en lípidos no polares en halobacterias es del 7 al 20% de los lípidos totales (Tornabene y col., 1969; Kates, 1978) y son compuestos derivados de isoprenoides, pudiendo agruparse dentro de cuatro clases de acuerdo con la longitud de la cadena.

I) C-20-isoprenoides, entre los que se encuentran el guanilgeraniol que ocupa un 11% del total de lípidos no polares (Mullakhanbhai y col., 1972; Kushwaha y Kates, 1978). El Di-O-fitanil-sn-glicerol con un 8% (Kushwaha y Kates, 1973).

II) C-30-isoprenoides, (Escualenos). Los escualenos comprenden cerca del 36% del total de los lípidos no polares

de *H. cutirubrum* (Krane y col., 1972; Kushwaha y col., 1975).

III) C-40-isoprenoides. En *H. cutirubrum* han sido aislados e identificados licoperseno, fitano cis y trans, licopeno y neo-caroteno (Kushwaha y col., 1972 y 1974; Kushwaha y Kates, 1973). Así como la vitamina MK-8 que ocupa casi el 8% de los lípidos no polares.

IV) C-50-isoprenoides. La bacterioruberina principal pigmento rojo, fue aislada primero de *H. halobium* por Petter (1931) y su estructura fue establecida años más tarde (Kelly y Liaaensen-Jensen, 1967; Kelly y col., 1970) como un carotenoide no cíclico tetrahidroxi C<sub>50</sub>. Se encuentran situados en la membrana plasmática.

### 3.5. Pared celular.

Estudios morfológicos y químicos de la cubierta celular de halobacterias demostraron que esta carecía tanto de mureína como de lipopolisacáridos, componentes típicos de la pared celular de eubacterias. (Brown y Schory, 1963; Larsen, 1967; Kushner y Onishi, 1968, Steensland y Larsen, 1969).

Los estudios de Stoeckenius y Rowen (1967) en *H. salinarium*, indicaron que por el exterior de la membrana plasmática se encontraba una pared celular formada por dos capas constituidas fundamentalmente por proteínas.

Blanrock y col., (1976), basándose en análisis de difracción de rayos X, indicaron que la pared celular de *H. halobium* presenta una bicapa de unos 13 nm de espesor con un amplio espacio periplasmático de 65Å. El análisis de sus



componentes (Mescher y col., 1974) indicaron un elevado contenido proteico (63% del peso seco), lípidos (21% del peso seco), hexosas y muy pocos aminoácidos.

Posteriormente, Mescher y Strominger (1976), estudiaron con detalle la pared celular de *H. salinarium* y comprobaron que se trata de una glucoproteína en la que la porción glucídica está unida covalentemente a la parte proteica. Experiencias realizadas con enzimas proteolíticas y con el antibiótico bacitracina (que actúa bloqueando la glucosilación de esta proteína) demostraron que se trata realmente del componente responsable de mantener la morfología celular y que la porción glucídica desempeñaría en ello un papel esencial (Siewert y Strominger, 1967; Mescher y Strominger, 1976; Rodríguez-Valera y col., 1983).

Por debajo de una concentración salina, 1,0-1,5M de NaCl para *H. halobium* y *H. cutirubrum* (Stoeckenius y Rowen, 1967; Lanyi, 1971), se produce la desintegración de la pared celular poniéndose de manifiesto primero, un cambio en la forma cilíndrica a esferoidal, y luego la lisis brusca de la célula. La lisis celular se debe, no a un efecto osmótico, sino a la desintegración de dicha pared cuya composición en aminoácidos es extremadamente ácida, desestabilizando su estructura al eliminar del medio aquellos cationes que neutralizan las cargas negativas de las proteínas (Kushner y col., 1964; Mescher y Strominger, 1976); el catión más efectivo en la estabilización de esta estructura parece ser el  $Mg^{++}$  incluso a concentraciones inferiores a las de NaCl

(Kushner, 1964).

En el género *Halococcus*, la pared es mucho mas gruesa y resistente a la ruptura por medios mecánicos, no lisándose en presencia de muy bajas concentraciones de NaCl (Steensland y Larsen, 1971). Presenta al microscopio electrónico una capa de 55 a 60 nm de espesor (Kocur y col., 1972). Posee un mayoritario contenido en azúcares, mientras que el total de residuos de aminoácidos y aminoazúcares sólo representa un 7-15% del peso seco (Restad, 1975).

Se ha comprobado, que en este caso el componente responsable de la rigidez de la pared celular es un heteropolisacárido sulfatado, de forma semejante a otros polisacáridos sulfatados estructurales en algunas algas marinas (Steber y Scheleifer, 1975). La proporción de aminoácidos en la escasa porción proteica de esta pared, es bastante semejante a la descrita para las especies de *Halobacterium* (Brown y Cho, 1970).

### 3.6. Otros componentes.

Petter (1932), describió que algunas cepas de *H. halobium*, al igual que otras bacterias y cianobacterias, contenían vacuolas de gas, que vistas al microscópio óptico aparecen como orgánulos refractarios de contorno irregular. Este hecho fué confirmado por Honwink (1956) y Stoeckenius y Kunan (1968) que analizaron las proteínas de estas membranas vacuolares y observaron que son menos ácidas que la envoltura celular, de ahí su mayor estabilidad en ausencia de sal.

Los materiales de reserva no nitrogenados que sirven como un almacén intracelular de carbono y energía son frecuentes en organismos tanto eucariotas como eubacterias pudiendo estar presentes a la vez en las dos, en eucariotas y eubacterias o ser sustancias que se acumulen sólo en eucariotas o en eubacterias. Aquí en este último grupo se incluyen los granulos de poli- -hidroxibutirato (PHB), (Shively, 1974).

Robertson y col., (1982) observaron en *H. halobium* grandes cuerpos de inclusión amorfos parecidos a los encontrados por Kirk y Ginzburg (1972) pero sin membranas envolventes. Cuando Kessel y Cohe (1982) observaron al microscopio óptico las bacterias cuadradas de Walsby (1980) y encontraron en las células gran cantidad de gránulos oscuros que no eran refractarios a la luz, por lo que podían afirmar que no eran vacuolas de gas. Stoeckenius (1981), había sugerido que probablemente la mayoría de estos gránulos eran inclusiones de PHB.

Fernández-Castillo y col. (1986), estudiaron la acumulación de PHB en halobacterias en cultivos líquidos deficientes en nitrógeno, utilizando diferentes fuentes de carbono y distintas concentraciones de sales. Comprobaron que la cantidad de PHB producida variaba de unas cepas a otras (desde 1,2 al 17% del peso seco de la bacteria) e incluso cantidades inapreciables en otras especies como *H. halobium*.

Posteriormente, Fernandez-Castillo y col. (1987), estudiaron en profundidad la producción de un velo

superficial que se formaba en cultivos de *H. mediterranei* e indicaron que la molécula de este polímero se correspondía con la de ácido poli-B-hidroxibutírico.

En la Tabla II, se muestran las diferencias principales existentes entre los géneros descritos.

Tabla II. Principales características diferenciales entre los generos descritos de halobacterias

	<i>Halobacterium</i>	<i>Haloarcula</i>	<i>Haloferax</i>	<i>Halococcus</i>	<i>Natronobacterium</i>	<i>Natronococcus</i>
Morfología celular	bacilos largos	bacilos cortos pleomórficos	bacilos cortos pleomórficos	cocos	bacilos largos	cocos
pH óptimo de crecimiento	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0-9,5	9,5
pH mínimo de crecimiento	5,0	5,0-6,0	5,0-6,0	5,0-5,5	8,5	8,5
Requerimiento de aminoácidos	+	-	-	+	n.d	n.d
Requerimiento de Mg <sup>++</sup>	0,005M	0,005M	0,01-0,04M	n.d	0,01M	n.d
Concentración mínima de sales* o NaCl** para el crecimiento a 37°C	20% *	15% *	10% *	15% **	12% **	8% **

+: Indica requerimiento de aminoácidos.

-: Indica no requiere aminoácidos.

n.d: Indica no determinado.

### 3.7. Interés de las halobacterias.

Desde la antigüedad se ha utilizado la sal para la conservación de los alimentos y el curtido de los cueros, produciéndose la contaminación de estos productos por las bacterias halófilas extremas. Actualmente, se ha iniciado el empleo de estos microorganismos en múltiples aplicaciones, destacándose su utilización como modificadores organolépticos o para aumentar el valor nutritivo de los salazones (Ramos-Cormenzana, 1989).

Recientemente, se han sugerido numerosas aplicaciones de las halobacterias entre las que destacamos la utilización de sus productos de extracción como los de *Haloferax mediterranei* pudiendo aplicarse uno de ellos en la recuperación de petróleo (Antón y col., 1988) y otro de ellos como polímero biodegradable (Fernández-Castillo y col., 1986).

Sus enzimas poseen actividad a elevadas concentraciones salinas (God y Hartman, 1970; Izotova y col., 1983; May y Dennis, 1987).

También existe la posibilidad de utilizar estos microorganismos en la industria farmacéutica por las propiedades surfactantes de sus lípidos que podrían utilizarse en la preparación de liposomas (Ramos-Cormenzana, 1988). Así mismo, se ha detectado en *H. salinarium* la presencia de material parecido a la insulina en cantidades tales como las detectadas en *E. coli* (Rubinovitz y Shiloach, 1985). Otro producto de interés es el ácido cicosapentanoico,

ácido graso poliinsaturado que parece reducir los niveles de colesterol en sangre (Klausner, 1986).

Como modificadores de la respuesta biológica (Ruíz y col., 1989). En la recuperación de la actividad microbiana de suelos salinos, descontaminación de aguas salinas o alcalinas, para eliminar el nitrato utilizando bacterias halófilas desnitrificantes. Otras posibles aplicaciones podrían ser eliminar metales y otros elementos como fosfatos, para los cuales los tratamientos convencionales son costosos (Ramos-Cormenzana, 1989).

En *H. halobium* se ha detectado una proteína con características similares al producto del oncogen humano *v-myc*, el cual se encuentra en elevadas concentraciones en ciertos tipos de cánceres como los de ovario y riñones. Por ello, se han desarrollado métodos para la detección de anticuerpos contra esta proteína utilizando la proteína de *H. halobium* como antígeno abriéndose nuevas posibilidades a la detección del cáncer (Ben-Mahrez y col, 1988).

Por último, las halobacterias son un material idóneo para el estudio de sistemas de transferencia genética en procariotas ya que se pueden manipular con facilidad en el laboratorio (Charlebois y col., 1987).

Algunas halobacterias como *H. halobium* y especies relacionadas producen endonucleasas de restricción, con puntos de cortes específicos, habiéndose completado el mapa de restricción del plásmido pBR322 con una de estas enzimas (Schinzel y Borger, 1986).

### 3.8. Genética de Halobacterias.

Joshi y col., (1960), y Moore y MacCarthy, (1960) estudiaron por primera vez la genética de halobacterias.

Comprobaron que el ADN total de halobacterias puede ser separado en dos fracciones de acuerdo con el contenido en guanina más citosina (G+C) (Joshi y col., 1963). Las técnicas utilizadas normalmente son gradiente de densidad de CsCl (Moore y MacCarthy, 1969) o columnas con absorbentes de afinidad específica conteniendo adenina y timina, como el verde malaquita o bisacrilamida.

La fracción mayor de ADN (FI) contiene del 70% (*H. halobium*) al 89% (*H. cutirubrum*) del ADN total, con un término medio del contenido en G+C de 68 mol% (Pfeifer y col., 1982).

Siempre existe una fracción menor que comprende del 11 al 30% de ADN total ("ADN satelite" o FII), con un contenido en G+C de 58 mol%.

Los perfiles de elución de *H. halobium* y especies estrechamente relacionadas, aparecen semejantes pero existen diferencias en la cantidad de ADN FII. Los fragmentos que aparecen después de las digestiones con endonucleasas de restricción de ADN FI de *H. halobium* y especies afines son idénticos, sin embargo, había variaciones observables en los fragmentos de digestiones del ADN FII. (Ebert y Pfeifer, 1981).

Todos los genes halobacterianos caracterizados hasta el



presente, (genes de ARNr y ARNt, *bop* y *brp* y presumiblemente el gen del ARN 7S) están localizados en el ADN FI. La fracción del ADN más rica en A+T contiene ~~todo el ADNccc~~ (Pfeifer y Betlach, 1982).

La naturaleza y organización de las secuencias del "ADN no ccc" en FII ha sido estudiado en *H. halobium* cepa NCR817 utilizando una de las dos copias del elemento de inserción ISH1 (Pfeifer y Betlach, 1985). Las secuencias de "ADN no ccc" podrían representar bien secuencias más ricas en A+T dentro del cromosoma rico en G+C, o bien un trozo de ADNccc que es cortado durante la purificación. Una copia de ISH1 está localizada en el ADN FI, mientras que la segunda copia está presente en el "ADN no ccc" de la FII.

Aislando una serie de cósmidos conteniendo secuencias adyacentes, coincidentes parcialmente con la copia ISH1 en el ADN FII, fueron caracterizados segmentos contiguos de aproximadamente 160 Kb. Este segmento de ADN contiene unas "islas" de 70 Kb de ADN FII covalentemente unido a secuencias ricas en G+C (Pfeifer y Betlach, 1985). Copias de varios elementos de inserción así como por lo menos otras diez secuencias repetidas (elementos de inserción aún desconocidos o secuencias con homologías parciales de otras regiones genómicas) son agrupadas en estas "islas" de 70 Kb de ADN FII. Por el contrario el ADN FI contiene una gran porción de secuencias únicas. Estas "islas" de ADN FII están presentes en varias especies de *H. halobium*, *H. cutirubrum* y *H. salinarium*.

Simon (1978) hizo la primera caracterización de plásmidos. Este autor detectó por electroforesis tres plásmidos de peso molecular 26, 44 y 86 megadaltons (Mdal), en *H. salinarium* cepa 5, indicando a su vez, que la pérdida espontánea del plásmido de 44 Mdal estaba asociada con la pérdida de la capacidad para producir vacuolas de gas.

Weidinger y col., (1979) detectaron en *H. halobium* cepa NRC817, un plásmido de 100 Mdal que también estaba asociado con la formación de vacuolas de gas y quizás a la síntesis de bacterioruberina y membrana purpúrea. Pero al contrario de lo manifestado por Simon (1978), en este plásmido no había relación entre su pérdida y la de vacuolas de gas.

Pfeifer y col., (1981) aislaron ADNccc extracromosómico de diferentes halobacterias comprobando que tres cepas de *H. halobium* y una de *H. cutirubrum* que sintetizan membrana purpúrea y bacterioruberina, llevaban plásmidos de diferentes tamaños: pHH1 (95 Mdal), pHH2 (100 Mdal), pHH3 (50 Mdal) y pHCl (80 Mdal), que poseían amplias secuencias homólogas, que se confirmaron por mapas de restricción correspondientes utilizando las endonucleasas *EcoRI*, *TPstI* y *HindIII* (Weidinger y col., 1982).

Pfeifer y col., (1981) estudiaron a su vez otras cepas de halófilas morfológicamente distintas a las anteriores (*H. trapanicum* y *H. volcanii*, aislando dos plásmidos de cada una de ellas pHT1 de 80 Mdal, pHT2 de 4 Mdal y pHV1 y pHV2 de 60 y 4 Mdal respectivamente. Estos plásmidos no están relacionados con el plásmido pHH1 ni presentan secuencias

homólogas entre sí.

Gutiérrez y col. (1986) han detectado la presencia de megaplásmidos (de 100 a 300 Mdal) en la mayoría de las halobacterias. Estos autores sugieren la posible correlación entre los megaplásmidos y la expresión de características fenotípicas tales como la resistencia a metales pesados y a determinados agentes antimicrobianos.

Montero y col., (1990) utilizando un nuevo método de lisis, han aislado ADN total de cepas del género *Halococcus* así como ADN plasmídico a pesar de que hasta la fecha no se había descrito la presencia de plásmidos en *Halococcus morrhuae* (Ross y Grant, 1985; Pfeifer, 1988). Estos autores han detectado en la cepa tipo *H. morrhuae* cepa CCM537, dos plásmidos pHM1 y pHM2 con unos pesos moleculares de 48 y 6 Kb respectivamente, estudiando con detalle el plásmido pHM2 por su posible uso en el desarrollo de futuros vectores de clonación, tales como los actualmente iniciados con el plásmido pHV2 de *H. volcanii* cepa NCMB2012 (Charlebois y col., 1987; Cline y col., 1989a y 1989b).

Por otra parte, (Pfeifer y col., 1981) han observado que *H. halobium* presenta un alto grado de mutaciones espontáneas, apareciendo mutantes defectivos en formación de vacuolas de gas con una frecuencia de  $10^{-2}$  y mutantes en la síntesis de bacterioruberina, retinal o bacteriopsina con una frecuencia de mutación de  $10^{-4}$ .

Pfeifer y col., (1985) comprobaron que con excepción de los mutantes en la síntesis de retinal, las demás mutaciones

fenotípicas espontáneas estaban relacionadas con inserciones o deleciones en el plásmido pHH1. Al analizar los mutantes en la formación de vacuolas y sus revertientes, se vio que la formación de vacuolas de gas estaba controlada por genes del plásmido pero observaron que al introducir una inserción en el pHH1, provocaba más mutaciones, lo cual hace difícil la identificación de relaciones entre alteraciones fenotípicas.

Pfeifer y col., (1982) realizaron estudios de microscopía electrónica y análisis de restricción del ADNccc de halobacterias observando que junto al ADN extracromosómico de 100 Mdal (plásmido pHH1) aparece un ADN circular minoritario de varios tamaños.

Por técnicas de clonación e hibridación se ha indicado que el genoma de *H. halobium* y *H. volcanii* contiene muchas familias de secuencias repetidas de bajo número de copias (Sapienza y col., 1982), sugiriendo que estas secuencias repetitivas se transponen entre ellas, o bien que hay lugares que promueven a la recombinación plásmido-cromosoma, intracromosoma o intraplásmido.

Por otro lado, observaron que la presencia de estas secuencias repetitivas no son típicas de arqueobacterias, ya que no se han encontrado en termoacidófilas, ni existe otro genoma de procariotas con tanta complejidad en secuencias repetitivas, indicando que, el genoma de halobacterias se parece más al de eucariotas que al de eubacterias (Sapienza y col., 1982).

Así mismo, la presencia de este gran número de

secuencias repetitivas, así como la inestabilidad genética sugiere la presencia de elementos de inserción con un tamaño desde 750 pb a diversos pares de kilobases y se transponen con una frecuencia de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  por generación (Kleckner, 1981).

Se ha determinado la secuencia completa de ISH1, ISH2, ISH50 y ISH1,8 (Simsek y col., 1982; DasSarma y col., 1983). Los otros elementos de inserción están caracterizados mediante la determinación de los lugares de restricción y secuencias de ADN terminal (Pfeifer y col., 1984; Pfeifer y col., 1985). Se han caracterizado hasta el momento nueve elementos de inserción de *H. halobium*. Casi todas las copias de estos elementos están localizadas en la parte más rica en adenina más timina (región FII del ADN) del genoma de *H. halobium* y se encuentra tanto en las "islas" cromosómicas de la FII del ADN como en el ADNccc.

La mayoría de estos elementos están presentes exclusivamente en *H. halobium* y especies relacionadas no encontrándose secuencias homólogas con el ADN de otras bacterias. Las únicas secuencias comunes encontradas en todas las bacterias, son ciertos elementos de inserción (ISH) tales como ISH26 y el gen que codifica el ARN 7S.

Los estudios de hibridación de ADN/ARNr 16S realizados por Ross y Grant (1985) en un grupo de arqueobacterias alcalofílicas, les permitieron afirmar que existe una gran diversidad genética en las halobacterias y sugirieron que según estos datos, deberían agruparse en nueve grupos

distintos, que coincidirían además con los obtenidos anteriormente en el estudio de lípidos polares (Ross y col., 1985). Indicaron que podría existir homología en el ADN entre cepas de grupos homólogos en el ARNr (superior al 33%) y que también existiría entre cepas de diferentes grupos no homólogos en el ARNr.

Sólo se han aislado y caracterizado perfectamente, unos cuantos fagos halobacterianos, algunos de ellos se han obtenido en estanques salinos de Yallah, Jamaica o de la Bahía de San Francisco ( Torsvik y Dundas, 1974; Torsvik, 1982). Los fagos OH, ON de *H. halobium* y HS1 de *H. salinarium* aparecen espontáneamente en cultivos de laboratorio, pudiendo ser infectadas estas especies por los cristales de sales contaminados que se utilizan para hacer los medios de cultivos. Otra posibilidad es que el fago infecte lisogénicamente la célula huésped o esté presente en algún otro "portador" durante años. (Torsvik y Dundas, 1980; Schnabel y col., 1982; Torsvik y Dundas, 1984).

Las mutaciones espontáneas en halobacterias son muy frecuentes, detectándose mutantes que tienen alterada la producción de vacuolas de gas, bacterioruberina o bacteriorodopsina (Betlach y col., 1983; DasSarma y col., 1983; Juez y Rodríguez-Valera, 1984).

Las mutaciones espontáneas se reconocen por la aparición de colonias modificadas, lo que sucede con una frecuencia que oscila entre  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$ , habiéndose observado que las reversiones espontáneas reflejan probablemente la existencia

de mecanismos diferentes, mutaciones puntuales o inserciones de elementos transponibles (DasSarma y col., 1983).

Los primeros en utilizar agentes mutagénicos en halobacterias, fueron Spudich y Spudich (1982), utilizaron N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) en *H. halobium* para seleccionar mutantes alterados en la generación y regulación del flujo iónico a través de la membrana.

En 1983, Oesterhelt y Krippahl aislaron mutantes de *H. halobium* deficientes fotosintéticamente, utilizando luz UV, combinada con nitrosoguanidina o con 5-bromo-2'-dioxiuridina. Así mismo, la nitrosoguanidina ha sido utilizada para la obtención de mutantes de *H. halobium* que presentan el fototactismo alterado (Sundberg y col., 1985).

Bonelo y col. (1984) optimizaron las condiciones de letalidad y mutagenicidad de la nitrosoguanidina en *H. mediterranei* comprobando que este microorganismo es altamente resistente al efecto letal de dicho agente mutagénico. Así indicaron que era necesaria una concentración de 500 ug/ml de este mutágeno para obtener un nivel de supervivencia entre 1 y 10%.

Mevarech y Werczberger (1985), utilizaron etilmetanosulfonato (EMS) a una concentración de 12mM para obtener mutantes auxotróficos de *H. volcanii* cepa DS2. Encontraron 50 auxotrofos de 2.250 colonias probadas e identificaron 23 de ellos en sus requerimientos.

Estudiaron la reversión espontánea de estos mutantes, comprobando que en ningún caso se apreció la aparición de

revertientes. Por otra parte, estudiaron la posible transferencia genética entre parejas de mutantes de distinto fenotipo, comprobando que la frecuencia de transferencia es del orden de  $10^{-6}$ . Estos autores, indicaron que al ser éste el primer sistema de transferencia genética descrito sería interesante comprobar si existen sistemas similares en otras arqueobacterias.

Fernández-Castillo y col. (1990) utilizaron ácido nitroso, etilmetanosulfonato e hidroxilamina para obtener mutantes auxotróficos de *H. mediterranei* y observaron que el ácido nitroso era ineficaz y que el etilmetanosulfonato y la hidroxilamina presentaron una frecuencia de inducción de auxotrofos similar ( $2,8 \times 10^{-2}$  y  $3,6 \times 10^{-2}$  respectivamente).

Los mutantes obtenidos se analizaron individualmente en sus requerimientos y se identificaron 2 mutantes auxotróficos para la arginina ( $\text{Arg}^-$ ) procedentes de experimentos independientes con hidroxilamina y uno auxotrófico para la lisina ( $\text{Lis}^-$ ) procedente de experimentos con etilmetanosulfonato.

Posteriormente analizaron la frecuencia de reversión de estos mutantes y obtuvieron valores inferiores a  $10^{-9}$  salvo en el caso del mutante auxotrófico para la lisina que presentó una frecuencia de reversión de  $7,8 \times 10^{-9}$ .



#### 4. Las acridinas

El descubrimiento de las acridinas data de 1870 cuando Gaebe y Caro, a partir del carbón de brea sometido a altas temperaturas, aislaron un compuesto al que designaron con el nombre de "acridina", o sustancia acre, debido a los efectos irritantes de sus vapores sobre las membranas mucosas. La purificación de esta sustancia permitió un mejor estudio de la misma y consecuentemente el establecimiento de su fórmula empírica ( $C_{13}H_9N$ ) (Benthes, 1878). Desde entonces, han sido sintetizadas una gran cantidad de acridinas con diferentes sustituyentes.

El interés del uso de las acridinas como colorantes, comenzó con el aislamiento en 1862 de crisanilina (3-amino-9-p-aminofenilacridina) como un subproducto en la fabricación de magenta. En 1890, comenzó la obtención de diversos colorantes de acridina para el comercio de la tintorería y así aparecieron la naranja y el amarillo de acridina.

Posteriormente, aparecieron pigmentos de acridina resistentes a los ácidos y a los álcalis, colorantes insolubles que constituyen la mejor aportación de las acridinas al comercio del color.

El interés médico de las acridinas data de 1888, cuando Aucler utilizó crisanilina en investigación médica. Hacia el final del siglo pasado, se realizaron algunos estudios sobre aplicaciones clínicas de las acridinas, pero estos compuestos no volvieron a ser utilizados en medicina hasta que Browning (1913), descubriera sus propiedades antibacterianas.

Durante la Primera Guerra Mundial, la acriflavina y la proflavina, fueron introducidas como antibacterianos locales, para la prevención y tratamiento de sepsis en las heridas. En 1930 fue descubierta otra acridina, Atebrin (quinacrina), droga sintética muy utilizada durante la Segunda Guerra Mundial contra la malaria, en sustitución de la quinina cuando ésta no era útil (Nasim y Brychcy, 1979).

#### 4.1. Estructura.

La estructura de la acridina, compuesto base de los diversos colorantes de acridina, consiste en un núcleo formado por la fusión de tres anillos que poseen siete dobles enlaces conjugados.

En la molécula de acridina son posibles numerosas sustituciones por lo que han sido sintetizados y estudiados varios centenares de derivados, siendo importantes médicamente y muy utilizados como mutágenos especialmente los siguientes: proflavina, acriflavina, aminocrina (9-aminoacridina), quinacrina (mepacrina. Atebrin) y naranja de acridina.

#### 4.2 Usos medicinales y comerciales.

Los compuestos de acridina tienen una extensa variedad de aplicaciones y usos en medicina moderna, industria e investigación básica ( Browning, 1937; 1964; Albert 1966).

La acridina ha sido ampliamente utilizada como prevención y cura de diversas enfermedades en humanos y animales domésticos. La acción antibacteriana de la proflavina y acriflavina nace del uso extremadamente útil de estas acridinas en la primera mitad del siglo, en quimioterapia como antiséptico local para el tratamiento de heridas e infecciones bacterianas. Sin embargo, más recientemente éstas han sido reemplazadas por acridinas incoloras tales como aminoacridina que, cuando se aplica a los tejidos es invisible y consecuentemente ha sido utilizada en el tratamiento de infecciones de ojos, oídos, nariz y garganta, en trabajos dentales y cremas dermatológicas.

La acridina quinacrina (también conocida como mepacrina o Atebrín) es un agente terapéutico importante, muy utilizado todavía en regiones tropicales para el tratamiento de la malaria. Igualmente se utiliza en el tratamiento de otras enfermedades tropicales tales como amebiasis, artritis reumatoides, epilepsia y expulsión de tenias (infecciones helmínticas).

Las acridinas también han sido utilizadas en medicina para la estimulación del Sistema Nervioso Central, como antagonistas en clínica de los efectos locales de la morfina y para sedación. Se han hecho pruebas del uso de acridinas en

el control de tumores, en quimioterapia de enfermedades virásicas y diagnosticos citológicos de ensayos para el cáncer.

Comercialmente los colorantes solubles de acridina son utilizados como pigmentos y colorantes para teñir fibras vegetales, cueros y celulosas. También tienen utilidad en la desinfección industrial y preservación de metales y como antioxidantes e inhibidores de corrosión y algún uso limitado como reactivos fotográficos.

Las acridinas también son utilizadas como colorantes en el microscopio de luz y como colorantes fluorescentes en el microscopio de fluorescencia. La técnica de colorantes vitales ha sido utilizada para el estudio de fertilización y espermatogénesis y para seguir la mitosis y el ciclo de infección virásica en las células (Nasim y Brychcy, 1979).

Basandose en la fluorescencia de la NA se ha utilizado un método para detectar bacterias acuáticas principalmente marinas (Bergstroem y col., 1986).

También se ha utilizado la NA para la identificación de *Campylobacter pyloris* en las biopsias de tejidos gástricos teñidos con NA ya que esta, es un fluorocromo que se une a los ácidos nucleicos, lo que permite su utilización para detectar los microorganismos con suma rapidez (Walters y col., 1986).

Como coadyuvante en la conservación de muestras de bacterias marinas (Nishino, 1986).

Recientemente se ha utilizado un medio selectivo de

agar-acridina combinado con ceftazidime, para el cultivo de *Listeria* spp., obtenidas de productos alimenticios contaminados y de material biológico, lo que sirve para detectar rápidamente brotes de listeriosis humana (Bannerman y col., 1988).

Como método de diagnóstico rápido en la detección de septicemia meningocócica producida por *Neisseria meningitidis* (Lopez-Brea y col., 1985), o para la detección de bacterias adheridas a cateteres intravasculares, haciendo un examen directo de los cateteres teñidos con NA lo que parece ser un método rápido de diagnosis de infecciones asociadas a cateteres vasculares y más comodo que la tinción de Gram (Zufferey y col., 1988).

#### 4.3. Interacción con los ácidos nucleicos.

Los colorantes de acridina se unen al ADN de doble cadena mediante dos formas diferentes de interacción (Peacocke y Skerrett, 1956). Una, es un proceso de unión fuerte que llega a estar saturada cuando una molécula del colorante se enlaza a cuatro o cinco nucleótidos. La otra, es un proceso de unión débil que sucede a altas proporciones del colorante con relación al ADN y su límite se alcanza cuando una molécula del colorante está enlazada a un nucleótido.

Estudios de espectros de fluorescencia de complejos de colorantes de acridina con ADN y polideoxirribonucleótidos sintéticos, han indicado que, proflavina (Gräslund y col, 1969; Johnson y Bach, 1969), acriflavina (Chan y McCarte,

1970) y quinacrina (Lat y col, 1974), muestran fluorescencia normal cuando se enlazan en regiones del ADN ricas en AT, pero esta fluorescencia está casi completamente extinguida en presencia de pares de bases GC (Schreiber y Daune, 1974). Experimentos de absorción ultravioleta también han indicado que los enlaces de quinacrina están más cercanos a pares de bases AT que a pares GC en los polinucleótidos (Nastasi y col, 1976). Así parece ser que los procesos de unión fuerte, suceden preferentemente en regiones del ADN ricas en AT.

No obstante, no todos los enlaces de acridina están intercalados dentro de la molécula del ADN. Estudios de espectros de absorción y medidas de difracción con rayos X revelan que una fracción sustancial de colorante de acridina es enlazada electrostáticamente en el exterior de la molécula de ADN en una forma de enlace débil. (Neville y Davies, 1966; Sivaraja y Singh, 1973). Las acridinas pueden formar complejos con el ARN por mecanismos similares a los descritos para el ADN, pero el enlace con el ARN es débil.

#### 4.4. Mutagenicidad de las acridinas.

Al principio de la investigación con mutágenos químicos se demostró que la acriflavina inducía mutaciones de resistencia a fagos de *E. coli*. Desde entonces, los derivados de acridina (por ejemplo, acriflavina, proflavina, naranja de acridina y quinacrina), han sido reconocidos como mutágenos en una gran variedad de sistemas biológicos desde bacteriófagos a cultivos celulares de mamíferos.

En la Tabla III se muestran los sistemas biológicos sobre los que actúan las acridinas.

Tabla III. Sistemas biológicos sobre los que actúan las acridinas como agentes mutagénicos.

Organismos	Efectos	Referencias
<b>VIRUS</b>		
T2	Sustituciones y perdidas de bases.	De Mars, (1953).
T4		Orgel y Brenner, (1961).
<b>BACTERIAS</b>		
<i>Escherichia coli</i>	Cambios de bases.	Demerec y col. (1951). Sesnowitz-Horn y Adelberg, (1968). Newton y col. (1972). Kohno y Roth, (1974).
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cambios de bases.	Eisenstark y Rosner, (1956). Ames y Whitfield, (1966). Kohno y Roth, (1974).
<i>Bacillus subtilis</i>	Cambios de bases.	Stewart, (1968).
<b>LEVADURAS</b>		
<i>S. cerevisiae</i>	Mutagénico en Meiosis.	Magni y col. (1964).
	Antimutagénico en Mitosis.	
	Conversión de genes.	Davies y col. (1975).
<b>EUCARIOTAS SUPERIORES</b>		
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mutaciones letales ligadas al sexo.	Demerec, (1949). Clark, (1953).
<i>Bombyx mori</i>	Mutaciones letales ligadas al sexo.	Mukarami, (1972 y 1973).
Vegetales	Aberraciones cromosómicas.	Michaelis y Rieger, (1963).
Mamíferos	Aberraciones cromosómicas.	Allison y Paton, (1965). Ostertag, (1966). Buchinger, (1969 y 1970). Kato, (1974). Perry y Evans. (1975). Solomon y Bobrow, (1975).  Popescu y col. (1977).



#### 4.5. Mecanismo mutacional.

Han sido propuestos diversos modelos para explicar el por qué colorantes de acridina producen mutaciones. Para algunos de estos modelos es obligatoria la rotura del ADN, (Streisinger y col. 1966; Sarabhai y Lamfrom, 1969), mientras que para otros no es necesaria (Drake, 1970; Drake, 1976).

Los mecanismos esenciales que conducen desde la intercalación de las acridinas en el interior del ADN, a la producción de una mutación, son en gran parte desconocidos. La intercalación por si misma, no es suficiente para la mutagénesis. Lerman (1964), señala que no es correcto el mostrar cualquier correlación clara entre la capacidad de intercalación de la acridina y la eficacia mutagénica; algunos de los agentes intercalados relativamente fuertes, fallan al inducir mutaciones. Varios sistemas celulares tales como reparación, replicación y recombinación que se conocen en general como capaces de modificar e influir la producción mutacional de varias formas, pueden estar implicados en la mutagénesis con acridina (Strigini, 1965).

Majundar y col. (1985), han observado reparación en la oscuridad y obtención de mutantes en células de *Azotobacter vienlandii* tratadas con NA y cafeína después de haber sido expuestas a radiaciones UV.

#### 4.6 Acción fotodinámica.

Desde los primeros estudios con bacteriófagos y bacterias, se ha demostrado que las acridinas están entre los

colorantes que sensibilizan una variedad de organismos irradiados con luz blanca, produciendo un incremento en la letalidad y mutagenicidad. Esta acción es el llamado efecto fotodinámico (Kaplan, 1949).

En *E. coli*, la naranja de acridina en presencia de la luz visible tiene una importante acción bactericida comparada con la oscuridad.

En *Saccharomyces cerevisiae*, el tratamiento con naranja de acridina en presencia de luz visible, tiene un fuerte efecto tóxico en las células (Fhrig, 1973 y 1976). En células HeLa y cultivos de linfocitos expuestos a la luz visible se incrementa la rotura de cromosomas por la tripaflavina (Buchinger, 1969).

La acción fotodinámica de las acridinas tales como proflavina se ha demostrado en el fago T4 siendo un proceso mutagénico en sí mismo.

En contraste a su acción fotodinámica bajo la exposición a la luz visible, cuando los colorantes de acridina se añaden a la suspensión antes del tratamiento con luz UV, disminuyen la proporción de mutación y muerte. La razón de este efecto protector parece ser debido a que la presencia de acridinas causa una reducción en el porcentaje de formación de dímeros de pirimidina por subsiguientes dosis de UV (Beukers, 1965; Setlow y Setlow, 1967; Setlow y Carrier, 1967; Alper y Hodgkins, 1969; Alper y col. 1972; Forage y Alper, 1973). Esta inhibición de la formación de dímeros, es debida al hecho de que las moléculas de acridina se intercalan entre

bases del ADN (Sutherland y Sutherland, 1969).

#### 4.7. Efectos biológicos.

##### a) EFECTOS INHIBIDORES.

El tratamiento con compuestos de acridina tales como acriflavina, proflavina, naranja de acridina y quinacrina, producen inhibición del crecimiento así como de la síntesis del ADN, ARN y proteínas, e induce cambios morfológicos.

Estos efectos han sido observados en las células de organismos tales como *E. coli*, *Leptomonas karyophilus*, *Tetrahymena pyriformis*, fibroblastos de pollos y en sangre de pollos infectada con *Plasmodium gallinaceum* (Lasnitzki y Wilkinson, 1948; Schellenberg y Coatney, 1961; Stuart y Hanson, 1967; Chou y Ramanathan, 1968; Rosenkranz y Southwick, 1971; Rosenkranz y Micracil, 1973; Baker y Hardman, 1974).

La proflavina también produce un ligero efecto inhibitorio en la tasa de crecimiento en levaduras tanto haploides como diploides.

##### b) CURACION DE PLASMIDOS.

La curación lleva consigo la eliminación de un plásmido de una estirpe bacteriana y esto puede ser logrado completamente por métodos diferentes, incluyendo el tratamiento por acridinas (Campbell, 1962).

La acriflavina y naranja de acridina eliminan el factor

F en *E. coli* (Hirota e Ijima, 1957; Hirota, 1960). El tratamiento con acridina de múltiples estirpes de *Shigella flexneri* o de *E. coli* produce una total eliminación de los factores de resistencia.

El crecimiento celular es esencial para la curación, no produciéndose curación con naranja de acridina si las células no están en crecimiento.

Cambios morfológicos y fisiológicos en estirpes de *Syryptomyces rimosus* al ser tratados con acriflavina utilizada en este caso como agente en la curación de plásmidos (Ramos y col., 1986).

#### c) INHIBICION DE LA MULTIPLICACION DEL FAGO.

La proflavina y otras acridinas inhibe la multiplicación del bacteriófago, de tal modo, que el material liberado en la lisis del nuevo fago sintetizado no es infeccioso (DeMars, 1955; Scholtissek y Bott, 1964). La inhibición de la multiplicación del bacteriófago por los colorantes de acridina, está relacionada con la cantidad de colorante absorbida por el bacteriofago T2, que infecta las células de *E. coli* y varía con las distintas acridinas, dependiendo de la permeabilidad de la membrana celular para con el colorante (Silver, 1967).

Por último, hemos de destacar que una mutación en el gen *acrA* de *E. coli* hace que aumente la capacidad de unión de la acriflavina a la célula. Así como, QUE la presencia de algunos cationes aumenta la supervivencia de la bacteria en

medios conteniendo acriflavina.

Estos hechos indican la relación entre el gen *acra* y la capacidad de unión de la acriflavina a la célula (Nakamura y col., 1985).

## **OBJETIVO DEL TRABAJO**

Las halobacterias constituyen un grupo de microorganismos muy interesante para la realización de investigaciones genéticas, particularmente de agentes mutagénicos que tienen que actuar en medios con condiciones fisico-químicas muy extremas.

En este Departamento se ha realizado el estudio de los efectos mutagénicos con agentes químicos, tales como nitrosoguanidina, ácido nitroso, etilmetanosulfonato e hidroxilamina, todos ellos actúan modificando químicamente los ácidos nucleicos produciendo mutagénesis química.

La elección de la Naranja de Acridina, tuvo su origen en el deseo de completar estos estudios con agentes que actúan directamente en la unión a los ácidos nucleicos sin una modificación química, sino como agentes que impiden la replicación normal de los mismos.

La Naranja de Acridina, es un agente químico que clásicamente ha sido estudiado para todos los sistemas biológicos conocidos y que presenta actividades biológicas muy diversas que lo hacen ser un agente potencialmente muy interesante en investigaciones genéticas.

Por otro lado, la elección de las especies de halófilas extremas utilizadas, se hizo en función de tratar de abarcar un amplio abanico de representación de especies y estudiar si esta diversidad taxonómica influía de alguna manera en el

comportamiento de la Naranja de Acridina. Las bacterias elegidas fueron: una bacteria en forma de coco *Halococcus morrhuae*, dos bacilos *Halobacterium halobium* y *Amoebobacter morrhuae* y una forma cuadrada *Haloarcula californiae*.

La finalidad de esta investigación era doble:

a) Estudiar si la Naranja de Acridina tenía un comportamiento similar a los datos conocidos hasta ahora en un medio con una alta concentración iónica y

b) Analizar la influencia que ejercía el colorante sobre las halobacterias y su posible aplicación como agente mutagénico.

Para conseguir estos objetivos, se propuso el siguiente plan de actuación:

- 1) Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de las halobacterias.
- 2) Estudio de la influencia de las condiciones de cultivo (temperatura, concentración de sales, pH, presencia de fosfato mono y dipotásico, distintas concentraciones de glucosa y extracto de levadura), en los efectos que induce la Naranja de Acridina.
- 3) Estudio del efecto mutagénico de la Naranja de Acridina en la inhibición de sustratos usados en el metabolismo celular.
- 4) Estudio de la pérdida o ganancia de resistencia a antibióticos o metales pesados debido a la presencia de NA
- 5) Estudio de las características morfológicas (movilidad, tamaño y forma bacteriana) y fisiológicas (producción de



PHB y producción de EPS) de las especies estudiadas en presencia de NA.

## **MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES

### 1. Microorganismos.

Para la elaboración del presente trabajo se han utilizado las siguientes especies bacterianas, provenientes de colecciones internacionales:

*Haloarcula californiae* ATCC33799

*Halococcus morrhuae* CCM537

*Halobacterium halobium* CECT396

*Amoebobacter morrhuae* NCR51001

ATCC (American Type Culture Collection)

CCM (Czechoslovak Collection of Microorganisms)

CECT (Colección Española de Cultivos Tipo)

NCR (National Council Research)

## 2. Productos químicos.

### 2.1. Naranja de acridina

La naranja de acridina (NA) (Sigma), se preparó en agua destilada a las distintas concentraciones utilizadas y se esterilizó mediante filtración con membranas Sartorius de 0,45  $\mu$  de diámetro de poro.

### 2.2. Reactivo de la glucosa enzimática

Este reactivo fue suministrado por Química Clínica Aplicada S.A. disolviéndose el contenido de un vial de enzimas tamponadas/cromógeno con 50 ml de agua desionizada.

Las concentraciones de la disolución reactiva son:

Tampón fosfato pH 6,9 .....	100	mM
4-Aminoantipirina .....	0,8	mM
Ac.p-hidroxibenzoico.....	39,5	mM
Glucosa oxidasa.....	18.000	UI/L
Peroxidasa.....	1.100	UI/L
Estabilizantes.		

### 2.3. Compuestos nitrogenados

Se utilizaron a la concentración final de 0,1% en el medio de cultivo:

L-alanina	L-histidina
Alantoína	L-isoleucina
D-L-arginina	L-leucina

L-asparagina	L-lisina
L-aspártico	L-metionina
Betaína	L-ornitina
Creatina	L-prolina
D-L-etionina	Putrescina
L-fenilalanina	Sarcosina
Glicina	L-serina
L-glutámico	L-treonina
L-glutamina	L-triptófano
	L-valina

Los aminoácidos fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

Se disolvieron previamente en agua, de acuerdo con las características de solubilidad de cada uno de ellos (Index Merck), y se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

#### 2.4. Carbohidratos

Se utilizaron a la concentración final de 0,2% en el medio de cultivo:

Almidón	Lactosa
Amigdalina	Maltosa
D-celobiosa	D-manosa
Esculina	D-rafinosa
Fructosa	L-ramnosa

D-galactosa	D-ribosa
D-gluconolactona	Salicina
D-glucosa	Sacarosa
D-glucosamina	D-trealosa
Inulina	D-xilosa

Los carbohidratos fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

Se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

## 2.5. Alcoholes

Los alcoholes se utilizaron a una concentración final de 0,1% en el medio de cultivo:

Adonitol	Dulcitol
Eritritol	Etanol
Glicerol	D-manitol
Mesoinositol	Propanol
D-sorbitol	

Los alcoholes fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

Se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

## 2.6. Acidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se utilizaron a una concentración final de 0,1% en el medio de cultivo.

Acetato	D-N-acetilglucosamina
L-aminobutirato	L-aminovalerato
Benzoato	Butirato
Caprilato	Citrato
Fumarato	Gluconato
L-glutamato	p-hidroxibenzoato
Hipurato	Lactato
Malato	Malonato
Oxalato	Piruvato
Propionato	Quinato
D-sacarato	Salicilato
Suberato	Succinato
Tartrato	

Todos los ácidos orgánicos fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

Se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

## 2.7. Antibióticos

Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales (ug/ml) en el medio de cultivo que se indican en la tabla siguiente:

Ampicilina	100
Bacitracina	50 y 100
Eritromicina	100 y 500
Neomicina	10 y 100
Novobiocina	10, 50, 100 y 3000

Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

La ampicilina, neomicina y novobiocina se disolvieron en agua destilada. La bacitracina en etanol. La eritromicina y rifampicina en metanol. Se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

## 2.8. Metales pesados

Los metales pesados se utilizaron a las concentraciones finales (mM) en el medio de cultivo que se indican en la tabla siguiente:

Acetato de plomo	2,5, 5 y 10
Arseniato de plomo	5, 10 y 15
Cloruro de cadmio	0,5, 1 y 1,5



Cloruro de mercurio	0,0025, 0,005 y 0,025
Cloruro de cinc	0,5 y 1
Dicromato potásico	0,1, 0,75, 1, 1,25 y 1,5
Nitrato de cobalto	0,05, 0,1, 0,75 y 1,25
Nitrato de plata	0,01, 0,1 y 0,25
Sulfato de cobre	0,1, 0,75, 1, 1,25 y 1,5
Sulfato de níquel	0,5, 1,25 y 2,5

Todos los metales pesados fueron suministrados por Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, EE.UU.

Se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración con membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro. Las soluciones se guardaron a 4°C y no se usaron después de una semana de la preparación.

### 3. Medios de cultivo

#### 3.1. Cultivo y mantenimiento de las cepas

Para el cultivo y mantenimiento de las cepas se utilizó el siguiente medio: una solución base consistente en una solución de sales al 25% (a la que nos referiremos en adelante con las siglas "SW-25"), que conserva las proporciones relativas del agua del mar con una pequeña reducción de las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaHCO}_3$  con el fin de evitar la precipitación de estas sales a concentraciones más elevadas, a la que se le añadió extracto de levadura (Difco) al 0,5%. El medio se solidificó añadiendo agar

(Oxoid) al 1,5%.

Para preparar tanto la solución base de sales al 25% como otras soluciones a inferior concentración salina, se hicieron diluciones a partir de la siguiente solución de sales al 30% (Subow, 1931):

NaCl	.....	234,00 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	.....	39,00 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	.....	61,00 g
CaCl <sub>2</sub>	.....	1,00 g
KCl	.....	6,00 g
NaHCO <sub>3</sub>	.....	0,20 g
NaBr	.....	0,70 g
Agua destilada c.s.p.	...	1000 ml

Las diluciones requeridas para obtener las soluciones salinas a distinta concentración fueron las siguientes:

<u>SW%</u>	<u>SW 30 (ml)</u>	<u>Agua destilada (ml)</u>
30	100,00	—
25	83,33	16,67
20	66,66	33,34
15	50,00	50,00

El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 1N. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las cepas se sembraron en tubos de agar inclinado que

contenían el medio de cultivo y se incubaron a 37°C hasta la aparición de crecimiento (de 4 a 7 días). Posteriormente, se almacenaron a temperatura ambiente envueltas en bolsas de plástico para mantenerlas con un grado de humedad adecuado.

### 3.2. Medio base para el estudio de la utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos

NH <sub>4</sub> Cl .....	2 g
SW-25 .....	1000 ml
Agar (Oxoid) .....	15 g

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1N, y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos utilizados, están detallados en los apartados 2.3.; 2.4. y 2.5. de Materiales, así como las concentraciones a las que fueron empleados.

### 3.3. Medio base para la movilidad

Extracto de levadura (Difco)..	5 g
SW-25 .....	1000 ml
Agar (Oxoid) .....	4 g

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.4. Medio base para compuestos nitrogenados

SW-25 ..... 1000 ml  
Agar (Oxoid)..... 15 g

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Los aminoácidos utilizados están detallados en el apartado 2.2. de Materiales, así como las concentraciones a las que fueron empleados.

3.5. Medio base para antibióticos, metales pesados y estudios con Naranja de Acridina

Extracto de levadura (Difco).. 5 g  
SW-25 ..... 1000 ml  
Agar (Oxoid) ..... 15 g

Los antibióticos y metales pesados utilizados están detallados en los apartados 2.6. y 2.7. de Materiales, así como las concentraciones a las que fueron empleados.

3.6. Medio para el estudio de la producción de polisacárido

Extracto de levadura (Difco) .. 5 g  
Glucosa ..... 5 g

SW-25 ..... 1000 ml

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.7. Medio para el estudio de la formación del velo superficial

Extracto de levadura (Difco) .. 5 g

Glucosa ..... 5 g

SW20 ..... 1000 ml

Se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.8. Medio utilizado en el estudio del crecimiento de microorganismos en presencia de Naranja de Acridina a distintos pHs

Al medio base SW-25 se le añadió el tampón Tris-maleato modificado en la proporción necesaria para obtener los distintos pHs.

Se esterilizó por filtración utilizando membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

3.9. Medio para el estudio del efecto de los fosfatos en la viabilidad de los microorganismos en presencia de naranja de Acridina

Las soluciones de fosfatos se prepararon del siguiente modo: Se preparó por un lado, una solución de cloruro sódico

al 25% en agua, se ajustó el pH a 7,2 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Las soluciones de fosfatos a las concentraciones de 0,5; 1; 10; 50 y 100mM, se esterilizaron por filtración en membrana Sartorius de 0,45  $\mu$  de diámetro de poro y se añadieron a las soluciones de sales una vez frías para evitar la precipitación.

### 3.10. Medio Mínimo

NH <sub>4</sub> Cl .....	5,00 g
NaNO <sub>3</sub> .....	5,00 g
Extrácto de levadura (Difco)..	0,50 g
Glucosa .....	0,10 g
Solución de micronutrientes...	0,25 ml
Solución de sales al 25% .....	1000 ml
Agar (Oxoid).....	15,00 g

#### Solución de micronutrientes:

Tiamina.....	0,52 mg
Rivoflavina .....	0,52 mg
Pantotenato cálcico .....	0,26 mg
Nicotinamida .....	1,82 mg
Piridoxina .....	0,08 mg
Acido fólico .....	0,02 mg
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,92 mg
FeSO <sub>4</sub> .....	1,77 mg

MnSO <sub>4</sub> .....	0,15 mg
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,22 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	0.06 mg
Agua destilada .....	100 ml

El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 1 N. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

La solución de glucosa al 1% se adicionó por filtración al medio una vez esterilizado.

#### 4. Tampones

##### 4.1. Tampon tris-maleato modificado

El tampón tris-maleato se preparó siguiendo las indicaciones de Gomori (1955), sustituyendo el agua destilada por solución de sales al 25% para evitar la lisis celular.

Solución A (0,2M) de tris-maleato:

Tris-hidroximetil-aminometano ...	6,05 g
Acido maléico .....	5,80 g
Agua destilada .....	42,00 ml
SW-30 .....	208,00 ml

Solución B (0,2M) de NaOH.

NaOH .....	2,00 g
Agua destilada .....	42,00 ml

SW-30 .....208,00 ml

Se mezclan 50 ml de la solución A y X ml de la solución B (dependiendo del valor de pH que se necesite) y se diluye con SW-25 hasta un total de 200 ml, ajustando, si fuese necesario, hasta obtener el pH final deseado.

El tampón se esterilizó por filtración utilizando membranas Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro.

#### 4.2. Tampón de electroforesis (TBB)

Trizma base .....	108,00 g
EDTA sódico .....	9,30 g
Acido bórico .....	55,00 g
Agua destilada c.s.p. ....	1000 ml

A esta solución madre se le ajusta el pH a 8,2 y se le añade agua destilada hasta 10 litros, para obtener la solución de trabajo TBB 1X.



## METODOS

1. Estudio de la viabilidad de los microorganismos en medio líquido con distintas concentraciones de Naranja de Acridina.

A partir de un inóculo de aproximadamente  $4 \times 10^8$  cel/ml, se inoculan con 1 ml de cultivo, tubos con 9 ml de medio (SW-25) y se les añade NA a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100 ug/ml). Se incuban a 37°C con agitación y oscuridad y a distintos tiempos, (0, 16, 24, 40, 48, 72 y 88 horas), se hacen medidas de D.O. a 650 nm para calcular el número de células viables.

2. Estudio del crecimiento de los microorganismos a distintas temperaturas en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.

A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $4 \times 10^6$  cel/ml), se inoculan tubos que contienen 9 ml de medio (SW-25), añadidos con NA (50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* y 100 ug/ml para *H. morrhuae*), y sin ella, con 1ml de inóculo y se incuban con agitación y oscuridad a la temperatura correspondiente de cada experimento.

Periodicamente se toman alicuotas del cultivo para determinar la supervivencia mediante recuento en placa (SW-

25), tras las diluciones oportunas del cultivo y midiendo la D.O. a 650 nm.

El tiempo máximo de incubación fué de 72 horas y las temperaturas empleadas fueron de 28, 37, 42 y 50°C.

### 3. Estudio del crecimiento de los microorganismos en medio sólido con Naranja de Acridina.

Para este estudio se tomaron inóculos, tanto en fase exponencial (D.O. 0,5) a 650nm como estacionaria (D.O. 1,2), a 650nm, de cultivos de los microorganismos a estudiar y tras las diluciones oportunas se siembran placas con distintas concentraciones de NA (10, 25, 50, 75 y 100 ug/ml), así como un control sin NA, y se incubaron en oscuridad durante 37 días.

### 4. Obtención de microorganismos resistentes a la Naranja de Acridina.

Con el objeto de obtener microorganismos resistentes a las máximas concentraciones de NA, tomamos un inóculo de cada microorganismo crecido en placa a las distintas concentraciones de NA y lo sembramos en medio líquido con NA a estas mismas concentraciones, así como en un medio sin NA que actuaba como control.

A los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas se tomaron alicuotas y se hicieron siembras en placas sin NA, incubándolas a 37°C en oscuridad durante 37 días, al cabo de los cuales se estudió el crecimiento.

Posteriormente, el experimento se repitió en las mismas condiciones ya expuestas para confirmar la resistencia de los microorganismos a la NA.

**5. Estudio del efecto de la concentración de sales en la supervivencia con Naranja de Acridina en medio líquido.**

Se parte de un cultivo de D.O. 0.8, a 650 nm y se siembra un inóculo en tubos de 4,5 ml de los medios SW-15, SW-20 y SW-30, cuya composición se describe en el apartado 3.1 de Materiales.

La NA se añade a una concentración final de 50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* y de 100 ug/ml para *H. morrhuae*.

Se ajusta a pH 7,2 y se incuba a 37°C con agitación y oscuridad. Se mide la evolución de la absorbancia y se calcula el número de células hasta 88 horas por recuentos en placas.

**6. Estudio de la influencia del fosfato monopotásico y dipotásico en la viabilidad de los microorganismos tratados con Naranja de Acridina.**

Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (D.O. 0,8) a 650 nm de cada bacteria y se inoculan con 0,5 ml del cultivo tubos de 4,5 ml con el medio descrito en el apartado 3.10. de Materiales, en dos series paralelas, una con NA y otra sin ella.

Se incuban a 37°C en agitación y oscuridad durante 6 horas realizando controles del número de células a las 3 y 6

horas.

**7. Estudio para determinar si la glucosa influye en la viabilidad de los microorganismos en presencia de Naranja de Acridina.**

Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento y siguiendo los trabajos de Kanamura (1967), se inoculan tubos de 4,5 ml de medio que contienen una concentración de NA de 50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* y de 100 ug/ml para *H. morrhuae*, y distintas concentraciones de glucosa (0,5; 2,5 y 5,0 g/l) y un tubo con 0,5 g/l de glucosa pero tamponado con tampón tris-maleato a pH 7,0. El pH de los otros tubos se ajustó a 7,1-7,2.

A su vez, y con estas condiciones se hicieron cuatro series de tubos dependiendo de la cantidad de extracto de levadura que le añadimos al medio (0,1; 0,5; 1 y 5 g/l), agregándole a los tres primeros 5 g/l de cloruro amónico como fuente de nitrógeno.

Se incubaba a 37°C con agitación y oscuridad durante 72 horas, al cabo de las cuales se mide la D.O. a 650 nm, se hace control del número de células, se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos y al sobrenadante se le mide el pH, la concentración de glucosa y la concentración de NA final.

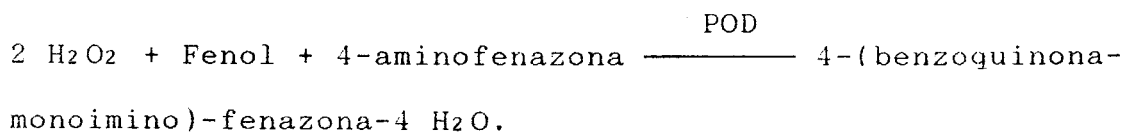
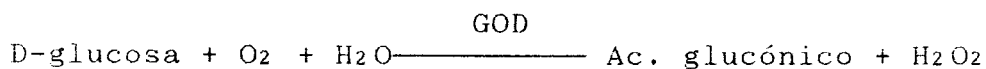
Para determinar la concentración de glucosa final se utilizó la técnica de la glucosa enzimática, según el método de Trinder modificado y siguiendo el protocolo que suministra

Química Clínica Aplicada S.A. (Madrid).

Se tomaron 0,02 ml del centrifugado y se mezclaron con 2,5 ml del reactivo de trabajo (Materiales 2.2.) dejándose reposar a 37°C durante 10 minutos en la oscuridad. Una vez desarrollado el color se lee en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 161 a 510 nm, utilizando como blanco 2,5 ml del reactivo de trabajo y como testigo 0,02 ml del Standard QCA diluido 1/10 v/v y 2,5 ml del reactivo de trabajo.

El color desarrollado tiene una estabilidad de una hora al abrigo de la luz solar.

Esta técnica es específica para la glucosa, no interfiriendo otras aldosas y consiste en que el enzima glucosa-oxidasa, transforma la glucosa en ácido glucónico, produciendo simultaneamente una cantidad equimolecular de agua oxigenada. A su vez el agua oxigenada, oxida un cromógeno adecuado apareciendo un producto coloreado.



#### 8. Estudio del consumo de Naranja de Acridina por los microorganismos.

Con este experimento se trata de saber si la concentración de NA inicial disminuye a través del tiempo. Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, con un número aproximado de células de  $4 \times 10^5$  cel/ml, y se inocula

con 10 ml de cultivo un matraz de 250 ml que contiene 100 ml de medio SW-25, con la correspondiente concentración de NA, (50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae*, y *H. halobium* y de 100 ug/ml para *H. morrhuae*). Se incubaba a 37°C con agitación y oscuridad.

A los tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas se toman alicuotas de 3 ml del cultivo y se centrifugan a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos. Al sobrenadante se le mide la D.O. a 450 nm en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer 161.

#### 9. Estudio de la viabilidad de los microorganismos cultivados con Naranja de Acridina a diferentes pHs.

Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento e inoculamos dos series paralelas de tubos. Una de ellas contiene el medio base SW-25 al que se añade tampón tris-maleato para alcanzar el pH correspondiente, (6,0; 7,0; 7,4; 7,8 y 8,6) y la concentración de NA adecuada (50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* y de 100 ug/ml para *H. morrhuae*), y a la otra serie no se le añade NA. Se disponen también dos tubos control, uno de ellos con el medio base sin tampón y con NA a pH 7,2 y el otro con el medio base solamente.

Los cultivos se incubaron a 37°C, con agitación y oscuridad. Se realizaron recuentos de células en cada toma de muestra a lo largo del tiempo. El experimento tuvo una duración de 48 horas para *H. californiae*, 72 horas para *H. halobium* y *A. morrhuae* y de 88 horas para *H. morrhuae*.

10. Estudios al microscopio de contraste de fase de los microorganismos crecidos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.

Se incuban las bacterias en medio líquido SW-25 a 37°C, con agitación y oscuridad hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se añaden entonces, 25, 50, 75 ó 100 ug/ml de NA, conservando un tubo como control. Se dejan las células en contacto con NA 3, 6, 9, 24 y 72 horas, al final de las cuales se observan en gota pendiente al microscopio de contraste de fases a fin de determinar su morfología a las distintas concentraciones de NA, así como la movilidad. Las fotografías se realizaron en un microscopio Polivar Reichert-Jung con contraste de fase utilizando filtro verde.

11. Estudio de la movilidad de los microorganismos en placa en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.

A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de aproximadamente  $4 \times 10^8$  cel/ml, se siembran placas con medio para la movilidad con NA (50 ug/ml) y sin NA. Se coloca en el centro de la placa un inóculo de 10 ul y se incuban a 37°C y en oscuridad.

Al cabo de 48 horas se mide el halo de crecimiento, realizándose mediciones, en principio, cada 48 horas y después cada 7 días hasta un total de 37 días.

12. Estudio del polisacárido extracelular de los microorganismos crecidos en presencia de Naranja de Acridina.

La producción del polisacárido extracelular de las halobacterias se ha llevado a cabo cultivando las bacterias en matraces erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio líquido que se describe en el apartado 3.7. de Materiales.

Se disponen dos series paralelas de matraces, a una de las cuales se le añaden 50 ug/ml de NA y se inoculan con 10 ml de una suspensión de las bacterias a estudiar que contiene aproximadamente  $4 \times 10^8$  cel/ml y se incuban a 37°C en un agitador incubador (New Brunswick Scientific) a 200 r.p.m. (Caviedes y col., 1982).

Los cultivos se incubaron durante 7 y 14 días al cabo de los cuales se hizo un control del número de células sembrando placas con medio sólido de SW-25 y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C para eliminar las células del cultivo. Para extraer los polisacáridos se siguió la técnica descrita por Amarger y col. (1967) modificada por nosotros: se adicionaron al sobrenadante dos volúmenes de acetona y se centrifugó la mezcla a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos obteniéndose un residuo que se recogió y se denominó como primera extracción, y el sobrenadante se mantiene a 4°C durante 24 horas, después de las cuales se centrifuga y se recoge una segunda extracción.

El precipitado se desecó en estufa y se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 24 horas. Se realizó una



hidrólisis con ácido sulfúrico 1N durante ocho horas, neutralizándose con carbonato de bario y el precipitado resultante se filtró con filtro Millipore de 0,45 u de diámetro de poro, congelando el filtrado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y liofilizándolo posteriormente.

El liofilizado se disolvió en 1,5 ml de agua desionizada para su posterior análisis en CLAR.

### 13. Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía.

Basándonos en los estudios de Stanier y col. (1956), se determinó la capacidad de los microorganismos para utilizar un gran número de sustratos como única fuente de carbono y energía: carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos. Se siguió la técnica de Koser (1923) con un medio base compuesto de solución de sales al 25%, adicionado con cloruro amónico al 0,2% y agar (Oxoid, 1,5%).

El medio se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se le añadió el sustrato adecuado, esterilizando separadamente por calor o por filtración en el caso de que sea termolábil o no se conozca su resistencia al calor.

Los medios se separaron en series paralelas de placas a una de las cuales se le añadió 50 ug/ml de NA.

En el caso de carbohidratos se empleó una concentración final del 0,2% y con los alcoholes y ácidos orgánicos de 0,1%.

Los compuestos ensayados en este estudio, están

detallados en los apartados 2.3., 2.4. y 2.5. de Materiales.

Se parte de suspensiones de células cultivadas en presencia y ausencia de NA. Se sembraron cada una de ellas, a su vez, en placas con NA y sin NA utilizando un replicador de Steers.

Se incubaron a 37°C y oscuridad procediéndose a la lectura periódica hasta los 37 días de incubación.

#### 14. Utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Se ha seguido la misma técnica y metodología que en el apartado anterior. El medio base está compuesto por solución de sales al 25% y agar (Oxoid 1,5%).

El sustrato se esterilizó por filtración y se añadió al medio hasta una concentración final de 0,1%.

Los compuestos ensayados en este estudio se encuentran detallados en el apartado 2.2. de Materiales.

#### 15. Estudio de la formación de velo superficial en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.

Partiendo de una suspensión de células de aproximadamente  $4 \times 10^8$  cel/ml, se inocularon con 10 ml del cultivo, dos series paralelas de matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio descrito en el apartado 3.8. de Materiales.

A una de las series se le añadió 50 ug/ml de NA para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* y 100 ug/ml para *H.*

*morrhuae* y la otra se conservó como control.

Una vez inoculados con la suspensión de células se incubaron a 37°C en oscuridad y sin agitación durante 30 días, pasados los cuales se centrifugaron a 7.800 r.p.m. durante 15 minutos.

Las células se lisan resuspendiéndolas en agua destilada y se mantienen a 4°C durante 24 horas, después de las cuales se centrifugan de nuevo a 1.600 r.p.m. durante 30 minutos, y se lavan repetidas veces con agua destilada hasta que aparezca un color blanco en el sedimento indicativo de la ausencia total de células.

El sedimento se seca a 80°C hasta peso constante y el polvo blanco resultante se disuelve en cloroformo destilado eliminándose la porción no disuelta por decantación. El cloroformo se deja evaporar a temperatura ambiente hasta obtener una película que se pesa en una balanza de precisión Sartorius.

El sedimento del polímero se calcula en relación con el peso seco celular.

#### **16. Estudio del comportamiento de los microorganismos frente a los antibióticos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.**

Se estudió la capacidad de resistencia de los microorganismos a los antibióticos en dos series paralelas, con NA y sin ella.

Se partió de inóculos de cultivos de células en

presencia y ausencia de NA y se sembraron placas de cada una de ellas a su vez con NA, utilizando un replicador de Steers.

El medio base utilizado fué el SW-25 del que se hicieron las placas control. Las placas se incubaron a 37°C y oscuridad procediéndose a la lectura periódica hasta los 37 días de incubación.

Los compuestos ensayados en este estudio están detallados en el apartado 2.6. de Materiales.

#### 17. Estudio del comportamiento de los microorganismos frente a metales pesados en presencia y ausencia de Naranja de Acridina.

Se siguió la misma técnica y metodología que en el apartado anterior, incluido el medio base.

El sustrato se esterilizó por filtración con membrana Sartorius de 0,45 u de diámetro de poro, y se añadió al medio hasta la concentración final requerida en cada caso, según se describe en el apartado 2.7. de Materiales.

#### 18. Análisis del perfil de plásmidos.

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, según el método de Eckardt (1978), modificado por Rosemberg y col. (1982).

Se centrifugan 200-500 ul de cultivo en fase exponencial y se resuspenden en 35 ul de solución lítica (Materiales 5.1.), cargándose las muestras inmediatamente en un gel horizontal de agarosa de 3mm de espesor (Tipo II Sigma), al 0.5% en tampón TBB (Materiales 4.2.).

La electroforesis se corre a 20v durante una hora y a 100v 3-4 horas más. El gel se tiñe durante una hora con bromuro de etidio (0.5 ug/ml en TBB), se destiñe durante 20 minutos en agua destilada y se visualiza en transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm. Se fotografía finalmente con película Kodak Tri-X Pan 400 ASA con filtro Kodak Wratten 23 A.

#### 19. Obtención de mutantes auxotróficos por tratamiento con Naranja de Acridina.

Para la obtención de mutantes auxotróficos se partió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento con una concentración aproximada de  $10^8$  cel/ml y se sembró en medio líquido SW-25 y SW-25 adicionado de NA, a las concentraciones adecuadas, incubándose a 37°C con agitación y oscuridad durante 48 horas, pasadas las cuales se sembraron placas de medio rico (SW-25).

Las colonias crecidas se sembraron siguiendo el método de replica con terciopelo en medio mínimo y medio rico. Se incubaron a 37°C durante 30 días y se observó la presencia de crecimiento.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

1. Crecimiento de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina.

El objetivo fundamental de este trabajo consiste en el estudio de la influencia de diversos factores sobre el crecimiento de bacterias halófilas extremas en presencia de Naranja de Acridina. En primer lugar, se determinó la concentración adecuada de NA para su utilización en experimentos posteriores.

Para ello, se realizaron las correspondientes curvas de crecimiento de cada una de las especies estudiadas a distintas concentraciones de NA (25, 50, 75 y 100 ug/ml).

En la Figura 1, se muestra el comportamiento de *A. morrhuae*, a las distintas concentraciones de NA probadas. Se observa que a 25 ug/ml prácticamente el número de células permanece invariable o aumenta ligeramente a lo largo del tiempo. En las otras concentraciones se muestra una disminución gradual del número de células a lo largo del tiempo y conforme se va aumentando la concentración de NA.

En la Figura 2, se presenta el comportamiento a lo largo del tiempo de *H. californiae* frente a las concentraciones de NA utilizadas. Cabe indicar que esta especie es algo más sensible a la NA que *A. morrhuae*, ya que a 25 ug/ml de NA se observa un descenso del número de células pasadas las 72 horas de exposición.

En las otras concentraciones de NA se observa un ligero descenso a partir de las primeras horas de contacto de la NA

Figura 1.- Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de *Amoebobacter morrhuae* a 37°C.

▨ Cultivos en presencia de NA: a) 25 ug/ml; b) 50 ug/ml; c) 75 ug/ml; y d) 100ug/ml.

■ Cultivos en ausencia de NA.



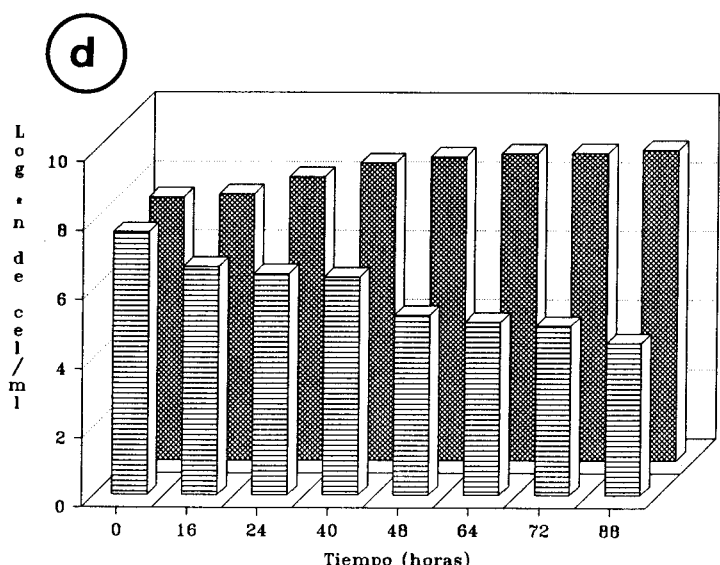
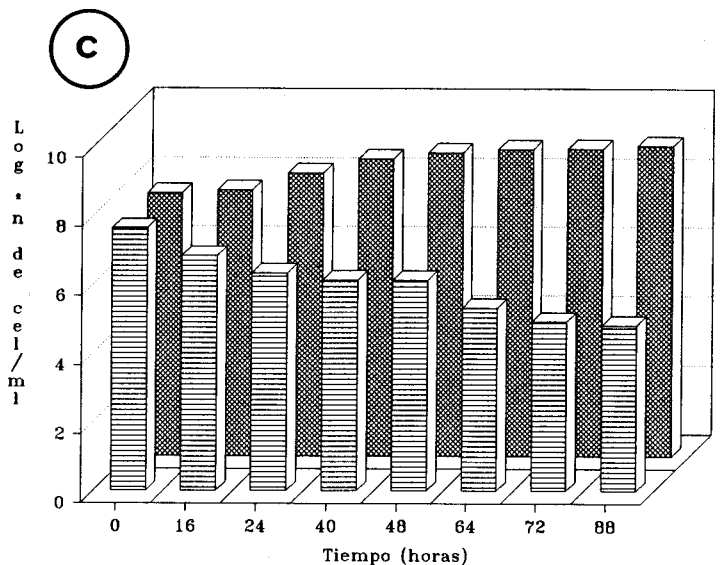
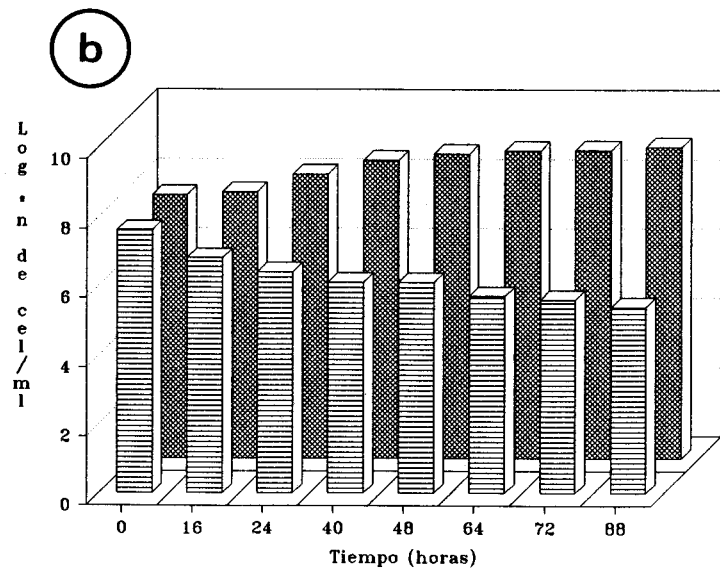
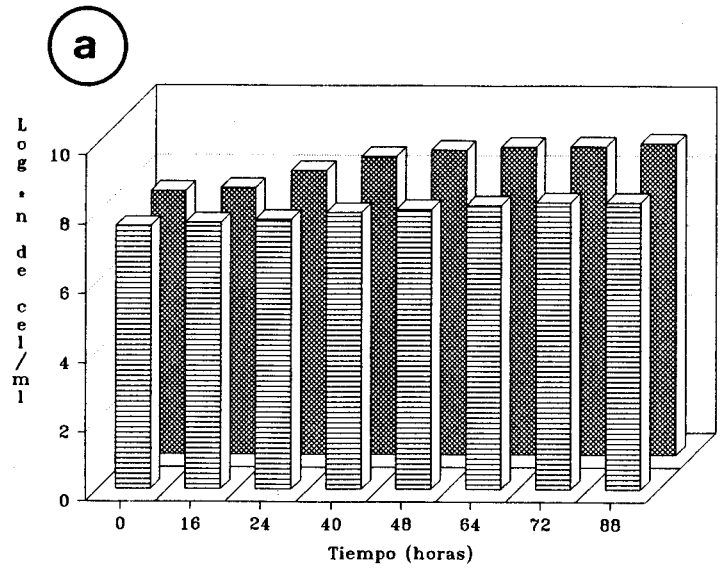
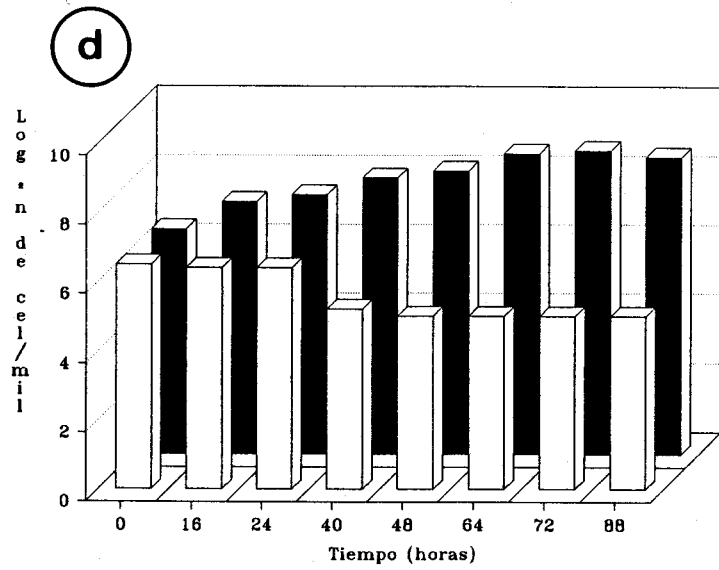
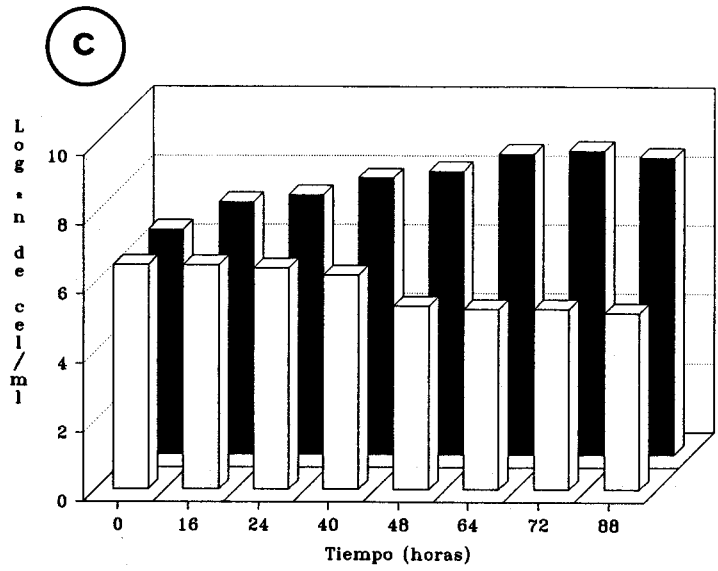
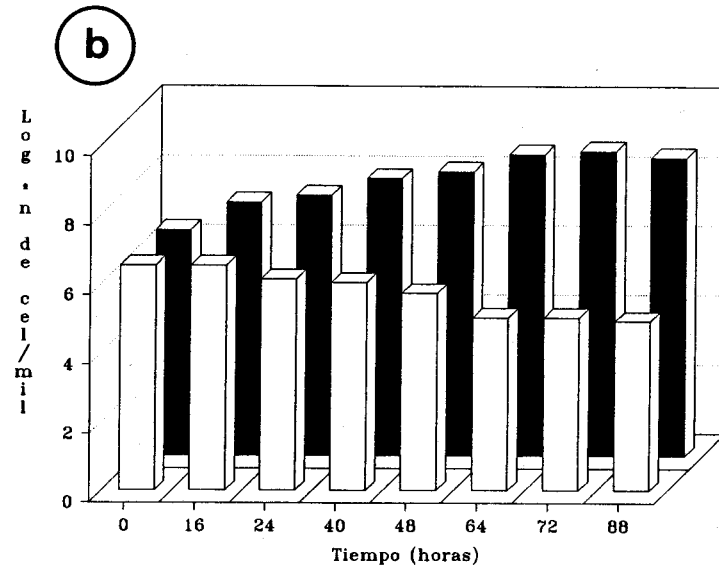
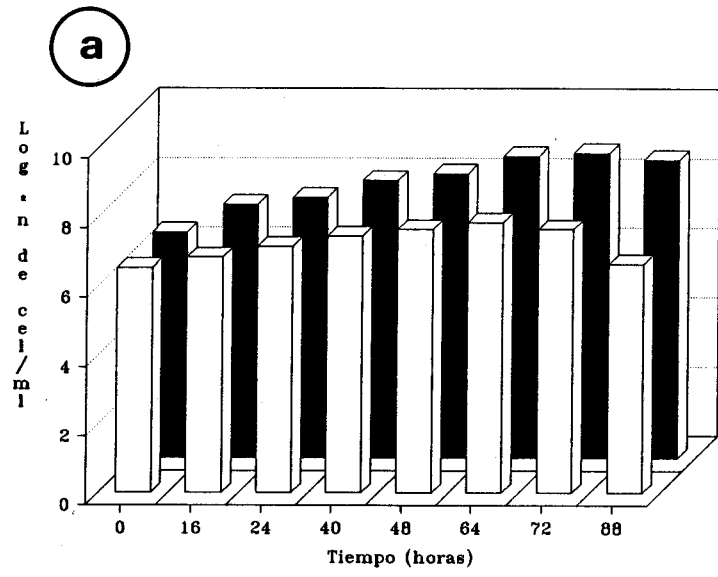


Figura 2.- Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de *Haloarcula californiae* a 37°C.

□ Cultivos en presencia de NA: a) 25 µg/ml, b) 50 µg/ml; c) 75 µg/ml; y d) 100µg/ml.

■ Cultivos en ausencia de NA.



con el cultivo, disminuyendo hasta valores de supervivencia similares a los de *A. morrhuae*, aunque cabe destacar que el aumento de la concentración de NA no disminuye la supervivencia del cultivo, presentando un comportamiento muy similar en las tres concentraciones.

En la Figura 3 se estudia la influencia que ejerce la NA en cultivos de *H. halobium*, observándose que a 25 ug/ml no se muestra una variación de la supervivencia del cultivo frente a la NA. A concentraciones de NA superiores cabe destacar un comportamiento similar al que presenta *H. californiae*, apreciando que a partir de 50 ug/ml de NA la supervivencia disminuye a lo largo del tiempo.

En la Figura 4, se estudia la inhibición del crecimiento celular de *H. morrhuae* en presencia de distintas concentraciones de NA. Se muestra que la concentración que ejerce un mayor efecto sobre el crecimiento bacteriano es 100 ug/ml, siendo inhibido el crecimiento en las otras concentraciones de NA, pero sin disminuir la supervivencia del cultivo bacteriano.

A la concentración con 100 ug/ml se consiguen niveles de inhibición similares a los que aparecen en las otras especies estudiadas aunque a otras concentraciones de NA.

En la Figura 5, se compara el crecimiento de cada una de las especies estudiadas a las cuatro concentraciones de NA ya mencionadas, tomando en cada caso, como punto de referencia el número de células alcanzado a las 88 horas.

Se observa claramente que por encima de una determinada

Figura 3.- Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de *Halobacterium halobium* a 37°C.

■ Cultivos en presencia de NA a) 25 ug/ml; b) 50 ug/ml; c) 75 ug/ml y d) 100 ug/ml.

■ Cultivos en ausencia de NA.

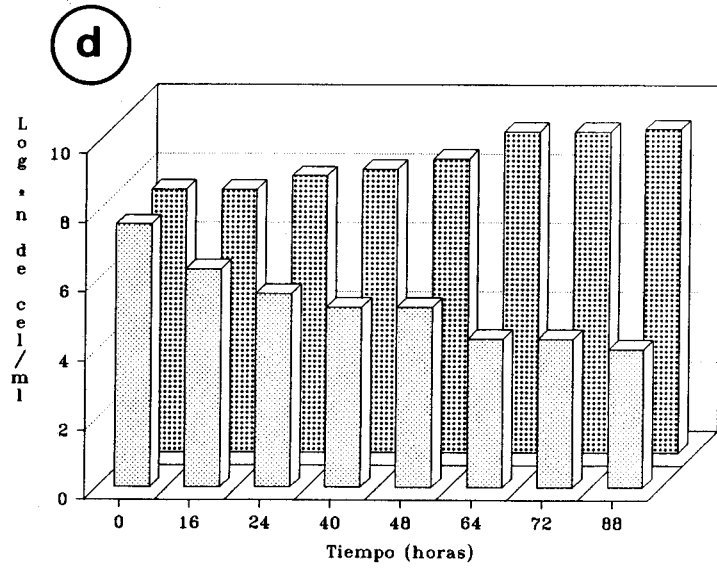
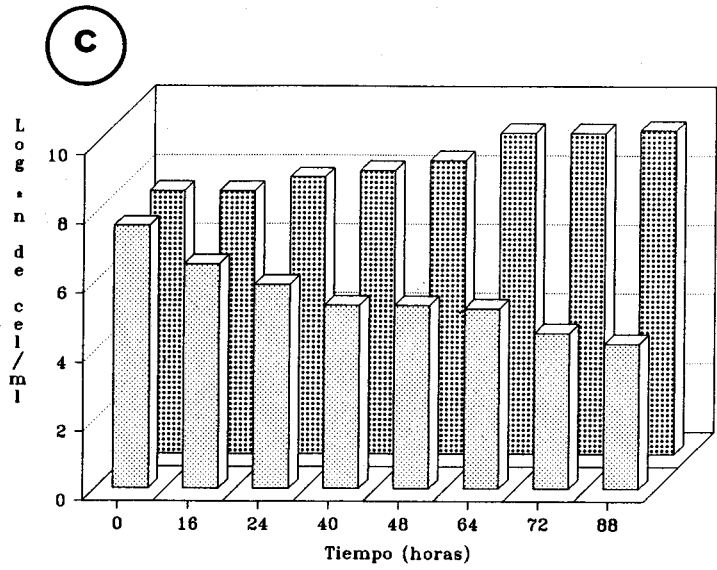
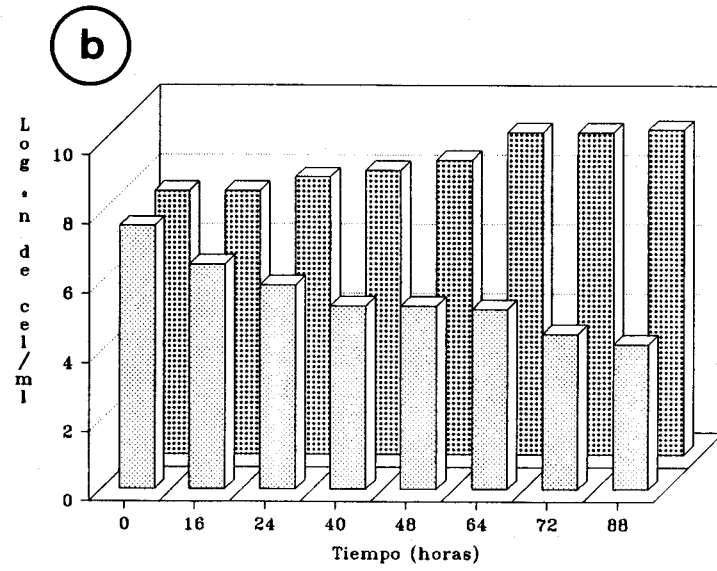
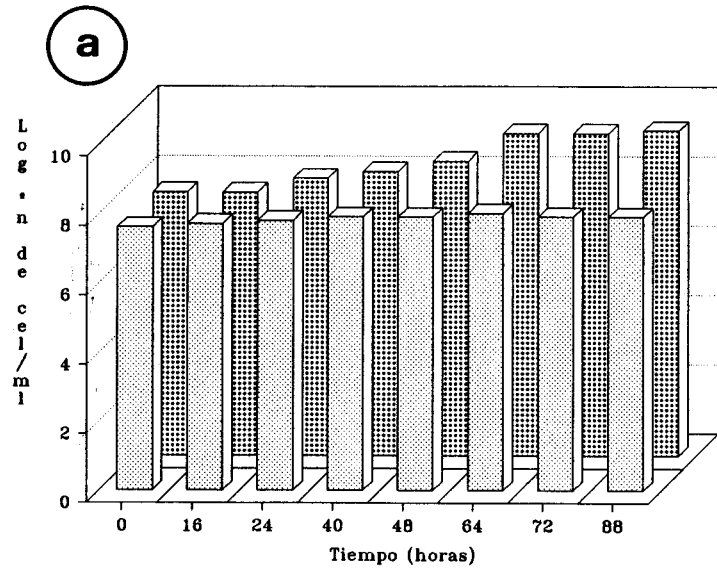
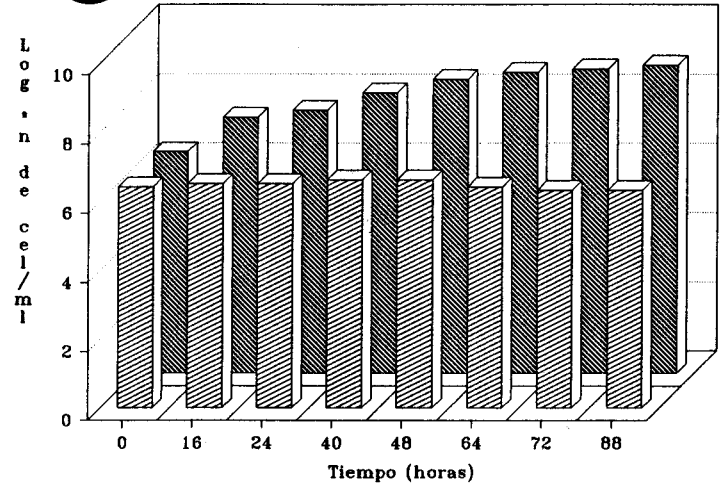


Figura 4.- Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de *Halococcus morrhuae* a 37°C.

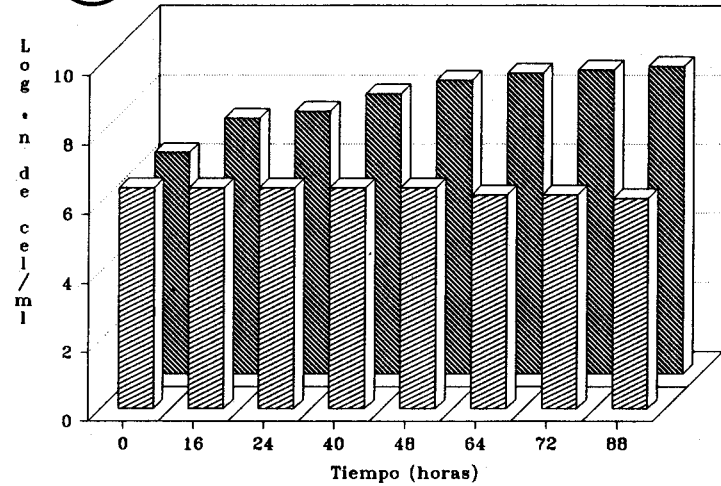
▨ Cultivos en presencia de NA a) 25 µg/ml; b) 50 µg/ml; c) 75 µg/ml y d) 100 µg/ml.

▩ Cultivos en ausencia de NA.

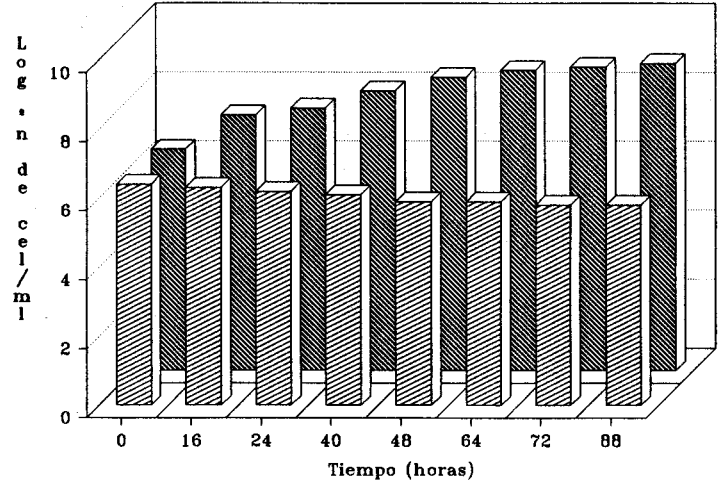
**a**



**b**



**c**



**d**

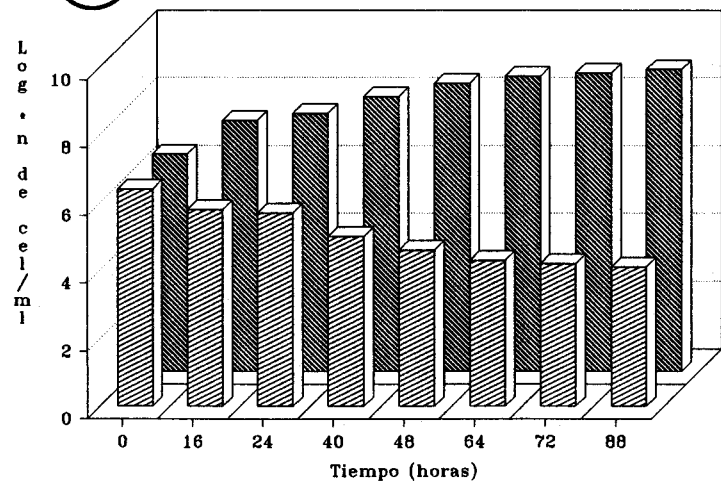


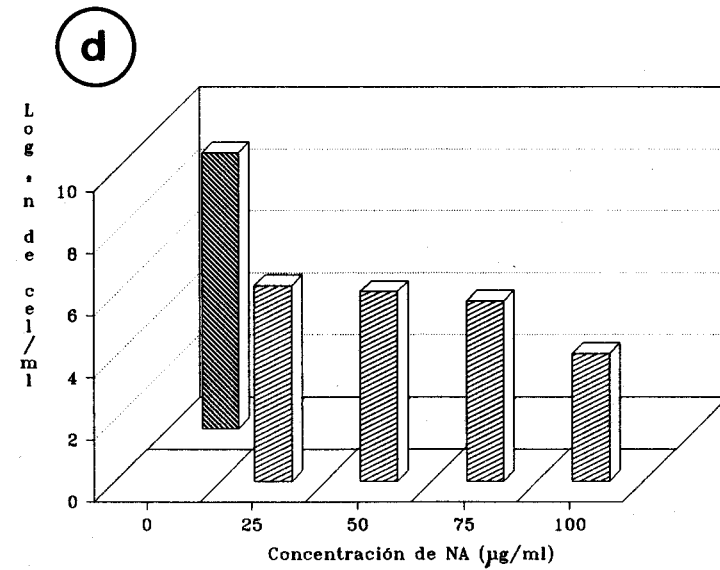
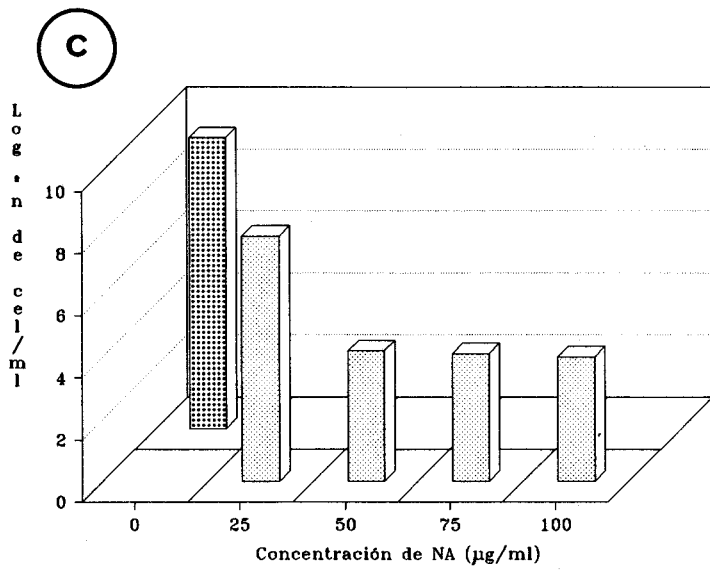
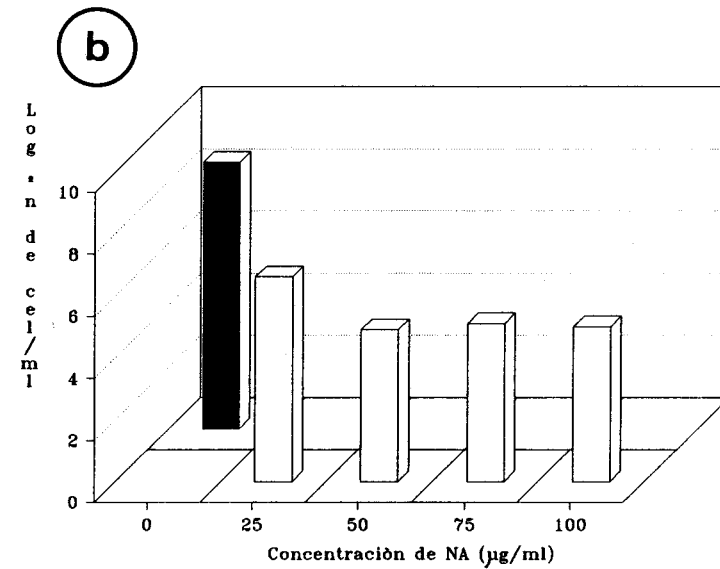
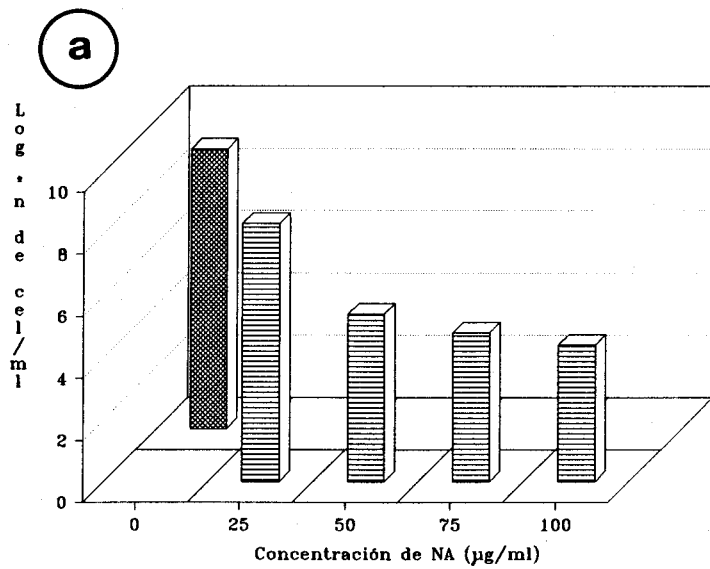




Figura 5.- Efecto de la Naranja de Acridina a distintas concentraciones, en cultivos de 88 horas de incubación, de: a) *Amoebobacter morrhuae*; b) *Haloarcula californiae*; c) *Halobacterium halobium* y d) *Halococcus morrhuae*.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.



concentración de NA, (*A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium*, 50 ug/ml y *H. morrhuae*, 100 ug/ml), no se incrementa el efecto de la NA sobre el cultivo bacteriano, existiendo quizás un efecto de saturación del agente mutagénico en el cultivo.

Se muestra que la cepa más sensible a la NA es *H. halobium* y la más resistente *H. morrhuae*, presentando un comportamiento similar. Quizás esto vaya en función que *H. morrhuae* posee una pared celular más rígida que las otras especies probadas y probablemente con menor concentración de componentes que actúan en la pared celular como intercambiadores iónicos o de unión a la NA, como indica Bown (1964), y por consiguiente, la NA penetra por simple difusión.

En función de estos resultados se eligieron las siguientes concentraciones de NA: 50 ug/ml para *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y 100 ug/ml para *H. morrhuae*, que se utilizarán en todos los experimentos posteriores.

## 2. Influencia de la temperatura en el efecto de la Naranja de acridina sobre el crecimiento de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Tal como se describe en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, las cuatro especies que se estudian en el presente trabajo, tienen distintas temperaturas óptimas de crecimiento, en algunos casos con diferencias muy significativas. Por esta razón, para este estudio, se eligió un rango de temperatura suficientemente amplio (28 a 50°C), y

se investigó si la NA podría variar su efecto a otras temperaturas de crecimiento diferentes a la óptima.

En las Figuras 6, 7, 8 y 9 se estudia la influencia de la temperatura sobre el efecto de la NA en la supervivencia durante 72 horas de cultivos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*, respectivamente. De las cuatro especies estudiadas, *H. halobium* y *H. morrhuae* no crecen a 50°C.

Se observa que a una temperatura menor de la óptima de crecimiento (28°C), las especies *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. morrhuae* no presentan afectada la supervivencia a la NA a lo largo del tiempo de incubación, aunque sí tienen una mayor inhibición del crecimiento que a 37°C, siendo los rendimientos de crecimiento a ambas temperaturas similares en ausencia de NA. En *H. halobium* está fuertemente inhibido el crecimiento a 28°C, siendo drásticamente reducido después de 72 horas de incubación.

Temperaturas superiores a 37°C influyen de manera diferente en las especies, observando que *H. californiae* y *A. morrhuae*, presentan tasas elevadas de crecimiento en ausencia de NA hasta 50°C, sin embargo, la NA influye sobre la disminución de la supervivencia conforme aumenta la temperatura y el tiempo de incubación respectivamente. Siendo sumamente sensible *A. morrhuae*.

*H. halobium* y *H. morrhuae* no crecen a 50°C y a 42°C son más resistentes a la NA que a 37°C, no observándose un efecto positivo sobre la supervivencia a lo largo del tiempo de

Figura 6.- Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento y la supervivencia de *Amoebobacter morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina.

≡ Cultivos en presencia de NA.

■ Cultivos en ausencia de NA.

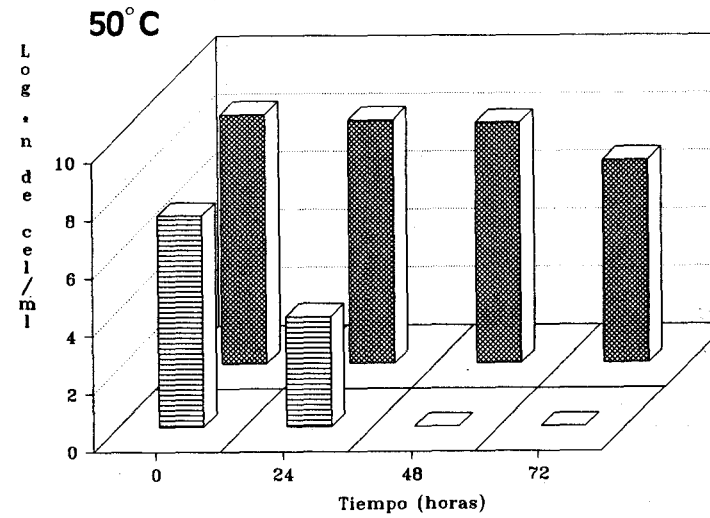
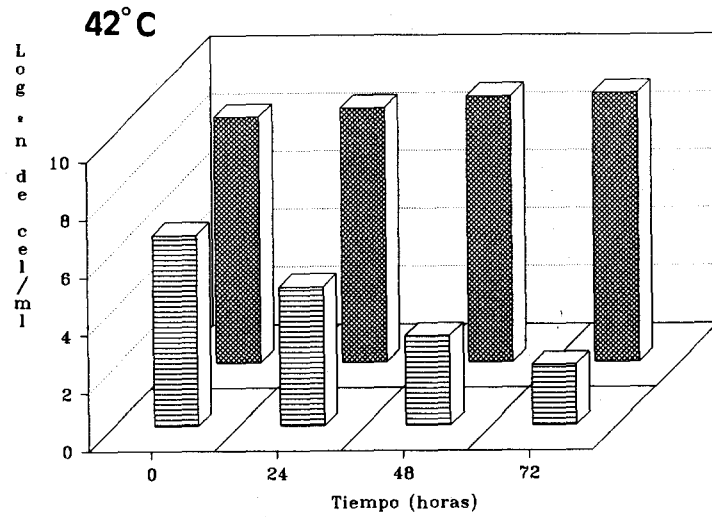
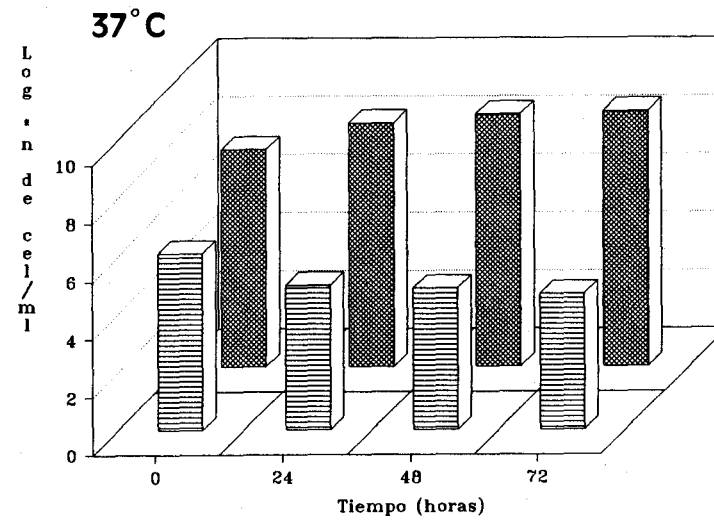
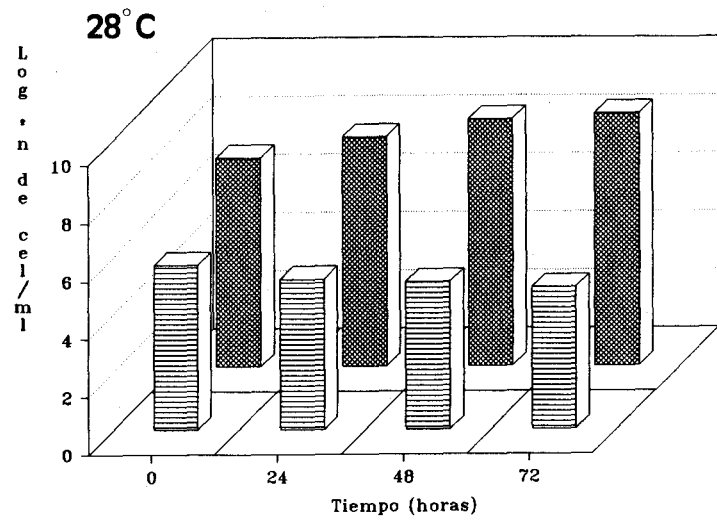


Figura 7.- Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento y la supervivencia de *Haloarcuula californiae* en presencia de Naranja de Acridina.

□ Cultivos en presencia de NA.

■ Cultivos en ausencia de NA.

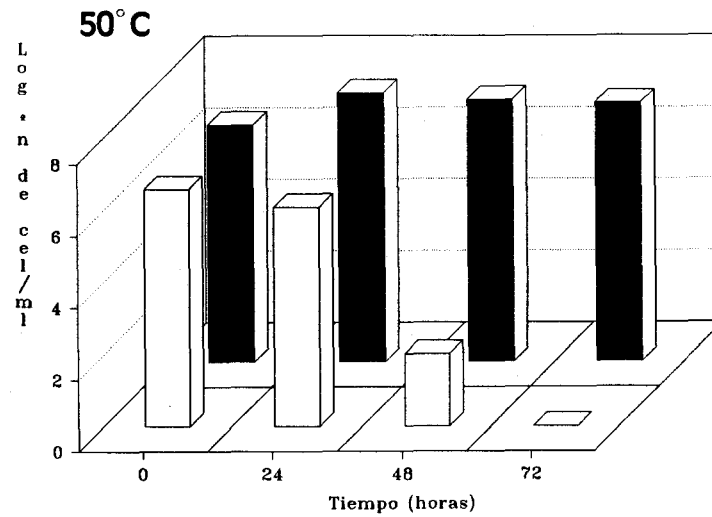
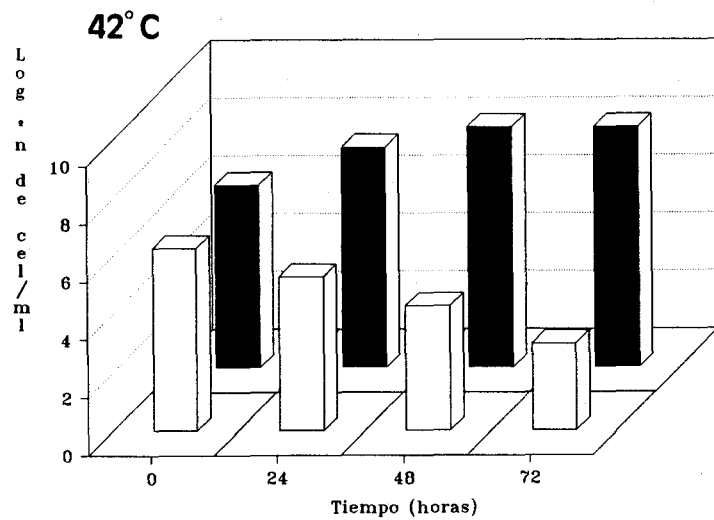
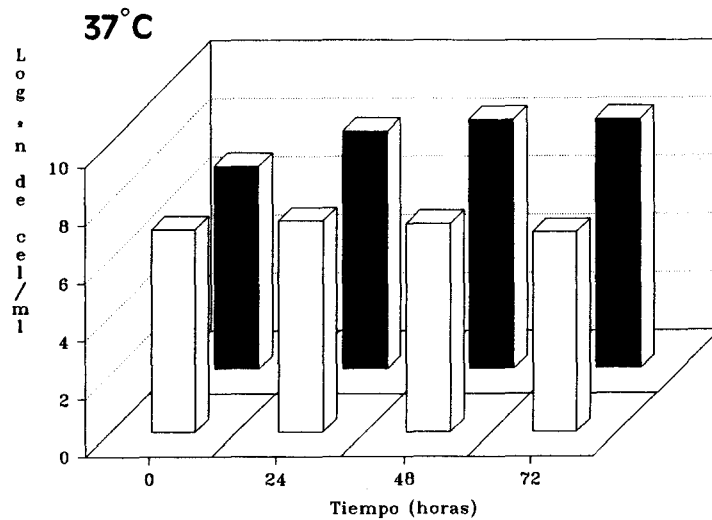
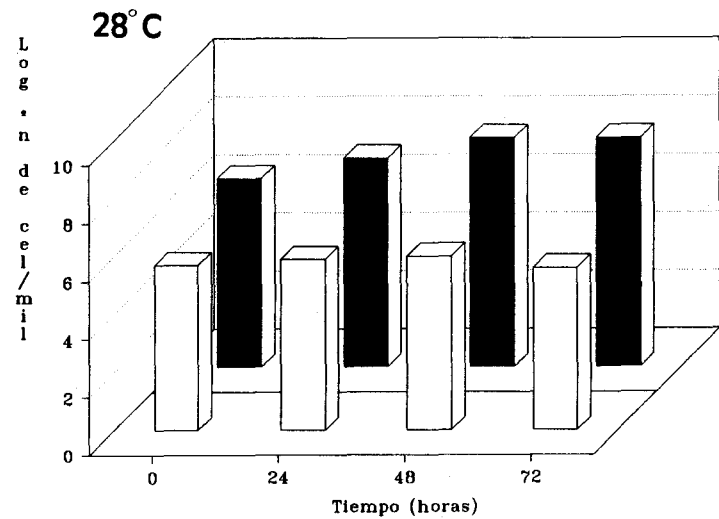






Figura 8.- Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento y la supervivencia de *Halobacterium halobium* en presencia de Naranja de Acridina.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

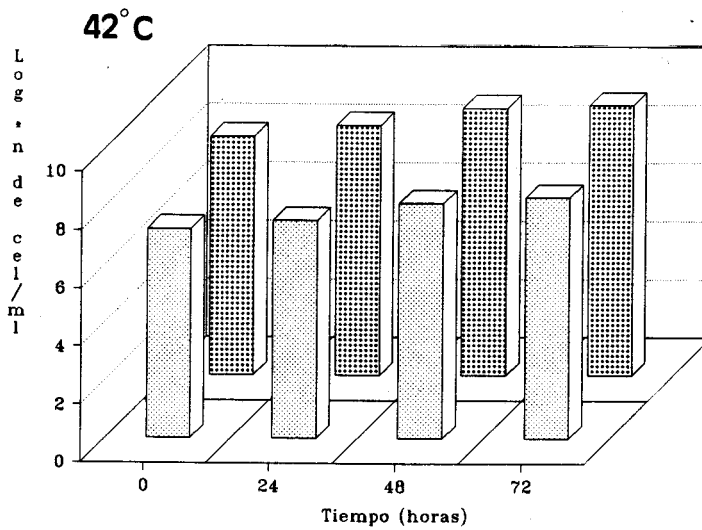
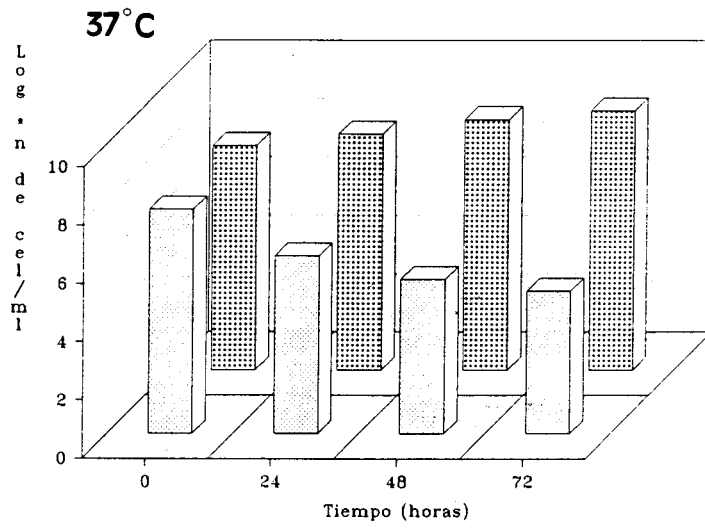
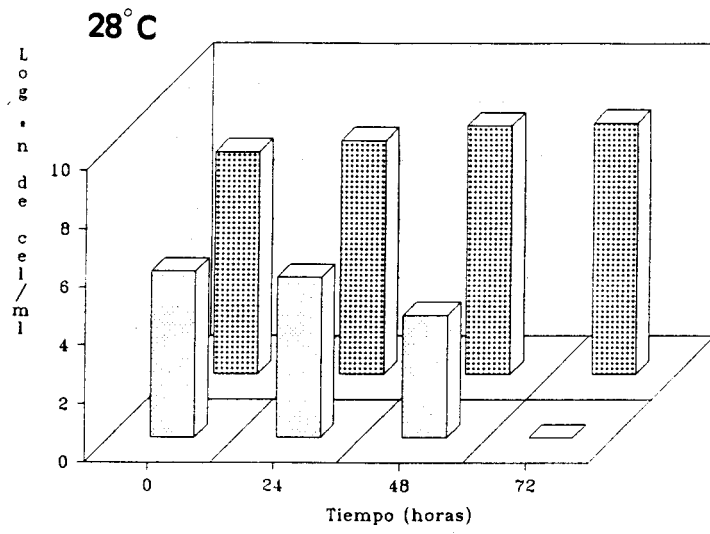


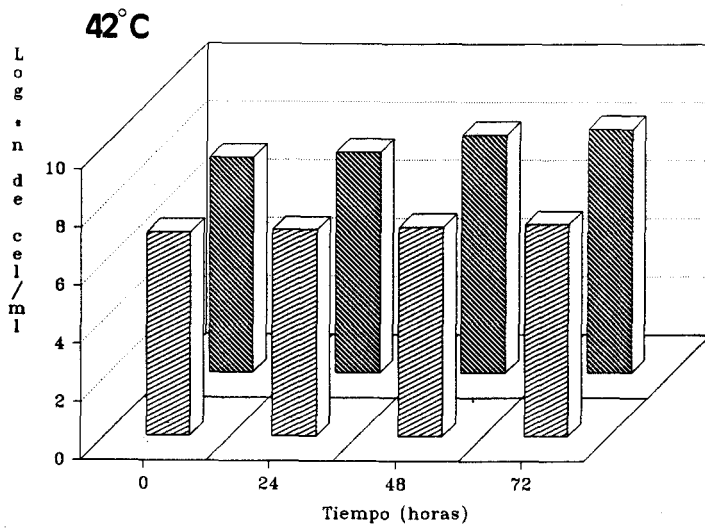
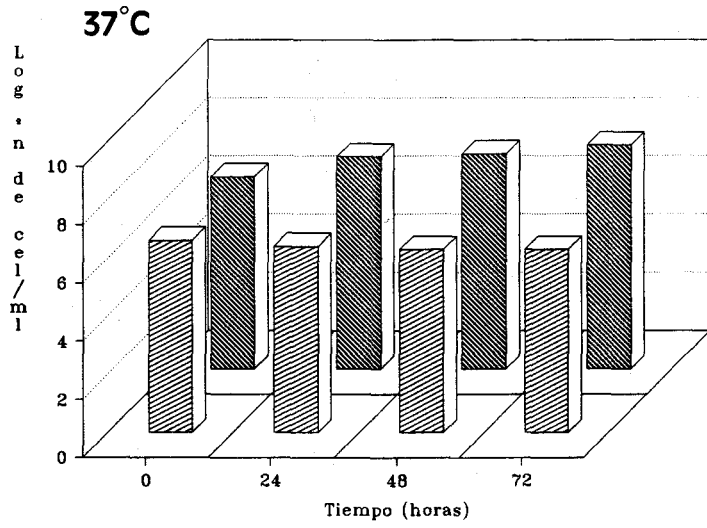
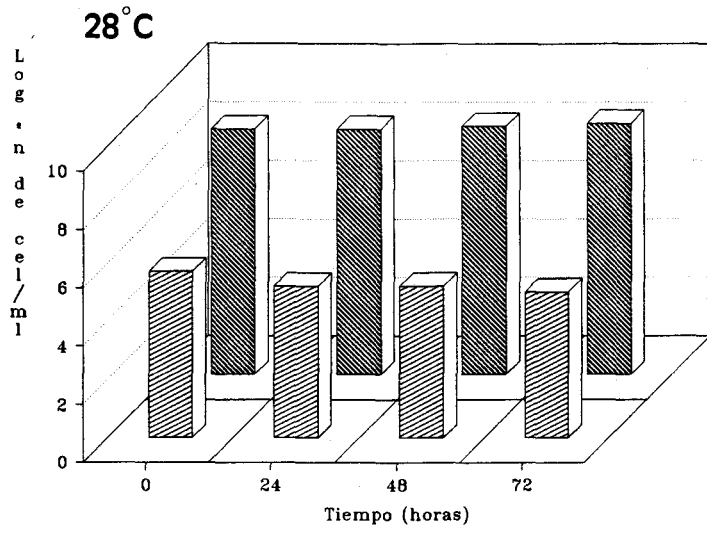


Figura 9.- Influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento y la supervivencia de *Halococcus morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.



incubación.

Los resultados obtenidos para *A. morrhuae* y *H. californiae* (temperatura superior a 37°C) y *H. halobium* (temperatura inferior a 37°C), están de acuerdo con las apreciaciones de Barker y col. (1978), que indican que en *E. coli* cepa K12 la NA inhibe el crecimiento más activamente a temperaturas no permisivas.

Por otro lado, los resultados obtenidos para *A. morrhuae* y *H. californiae* están en contraposición con los obtenidos por Nakamura (1966, 1967, y 1968) y Silver (1968), para *E. coli* que indican que a bajas temperaturas se absorbe una mayor concentración de NA.

### 3. Influencia de las fases de crecimiento del cultivo en el efecto de la Naranja de Acridina sobre *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Dado que la actividad metabólica de los cultivos bacterianos es diferente en las distintas fases de crecimiento y generalmente existe una alteración en la permeabilidad de la bacteria, se creyó interesante el estudio de la influencia que tendrían las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en el efecto de la NA sobre los especies bacterianas.

Para ello, se prepararon placas con medio SW-25 a distintas concentraciones de NA (10-100 ug/ml) y se inocularon con cultivos en fase exponencial y en fase

estacionaria de crecimiento.



En las Figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran la influencia de las fases de crecimiento en la supervivencia a la NA. Se observa que la supervivencia a la NA es menor en todas las bacterias cuando se utilizan cultivos en fase exponencial, siendo la más sensible *H. californiae* en fase exponencial y *A. morrhuae* en fase estacionaria.

En *H. halobium* el efecto de la NA en fase estacionaria es prácticamente nulo en todas las concentraciones, siendo afectadas en la fase exponencial tanto como *A. morrhuae*.

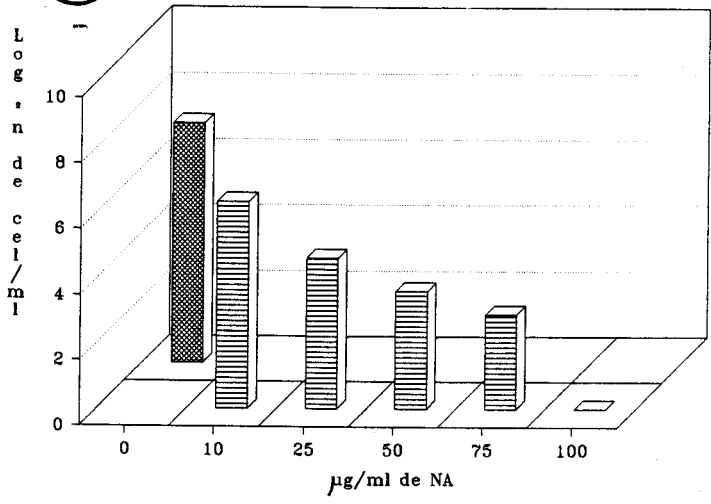
*H. morrhuae*, es la especie menos afectada por la NA tanto en fase estacionaria como en fase exponencial. Este hecho, podría explicarse porque la NA entra por permeabilidad activa, uniéndose específicamente a receptores de membrana, relacionados con permeasas de la lactosa (Silver, 1968) y en la fase exponencial la actividad del transporte activo es más elevada que en la fase estacionaria.

Se confirma con este experimento, que para tratamientos posteriores en medio líquido, se utilizarán concentraciones de 50 ug/ml de NA para *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* (aunque *A. morrhuae* y *H. halobium* dan una supervivencia adecuada a 75 ug/ml, se eligió esta concentración para unificar criterios de trabajo) y de 100 ug/ml de NA para *H. morrhuae*. Los cultivos como inóculos se utilizaron en fase exponencial de crecimiento.

Figura 10.- Influencia de las fases de crecimiento de cultivo en la supervivencia a la Naranja de Acridina de *Amoebobacter morrhuae*. a) fase exponencial de crecimiento; b) fase estacionaria de crecimiento.

-  Cultivos en presencia de NA.
-  Cultivos en ausencia de NA.

**a**



**b**

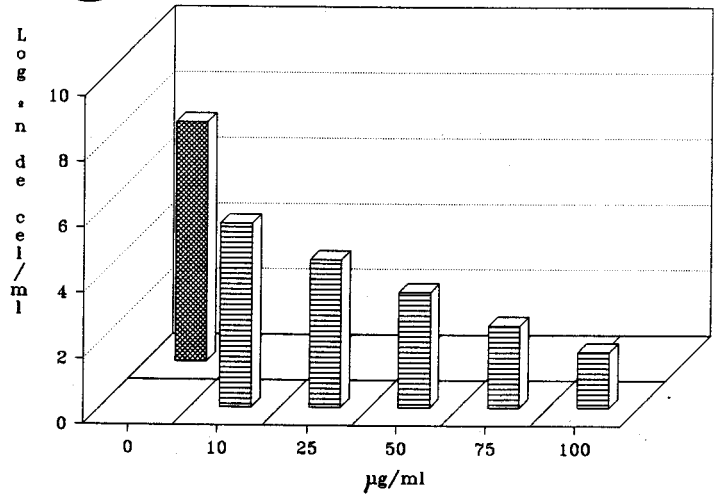


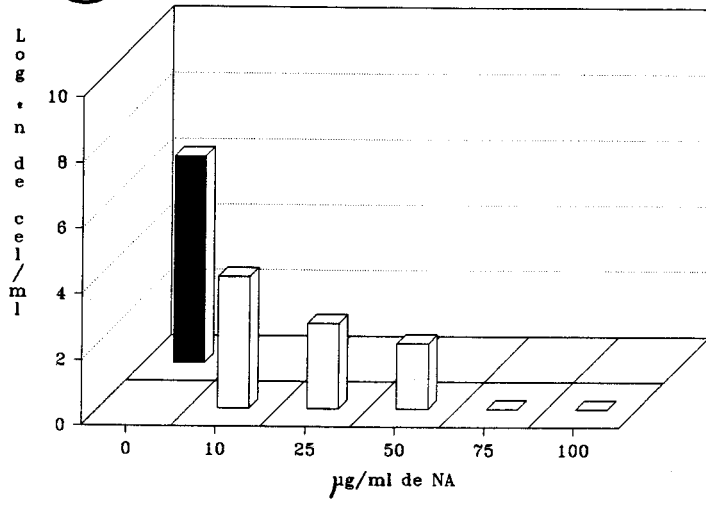


Figura 11.- Influencia de las fases de crecimiento del cultivo en la supervivencia a la Naranja de Acridina de *Haloarcula californiae*. a) fase exponencial de crecimiento, b) fase estacionaria de crecimiento.

□ Cultivo en presencia de NA.

■ Cultivos en ausencia de NA.

**a**



**b**

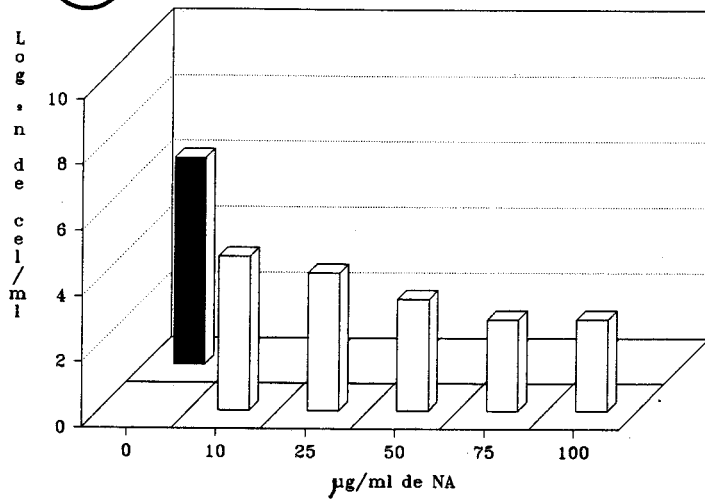




Figura 12.- Influencia de las fases de crecimiento del cultivo en la supervivencia a la Naranja de Acridina de *Halobacterium halobium*. a) fase exponencial de crecimiento, b) fase estacionaria de crecimiento.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

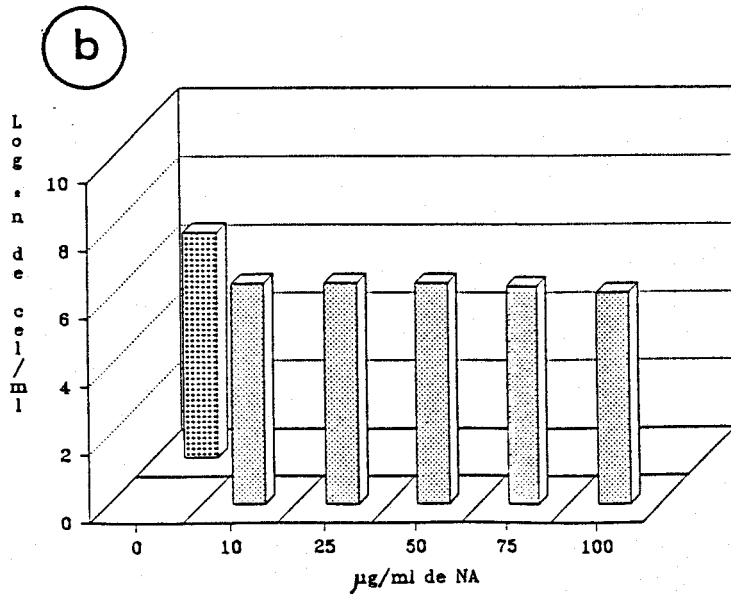
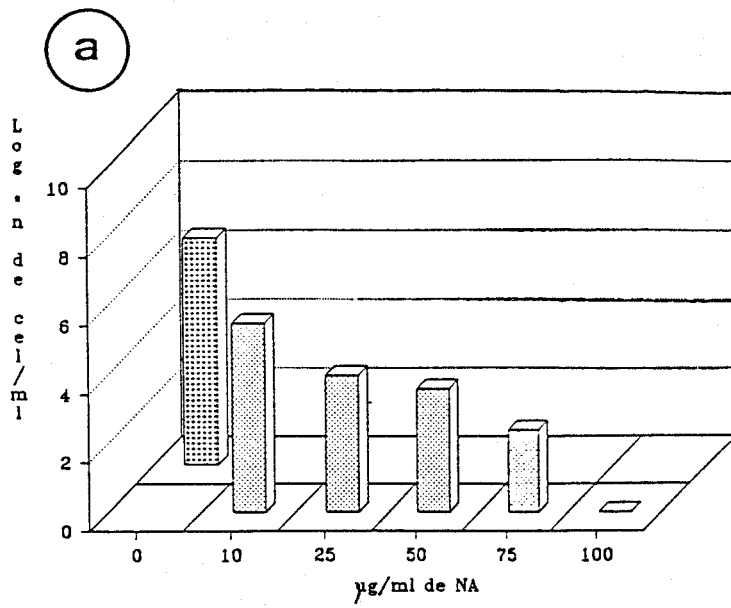
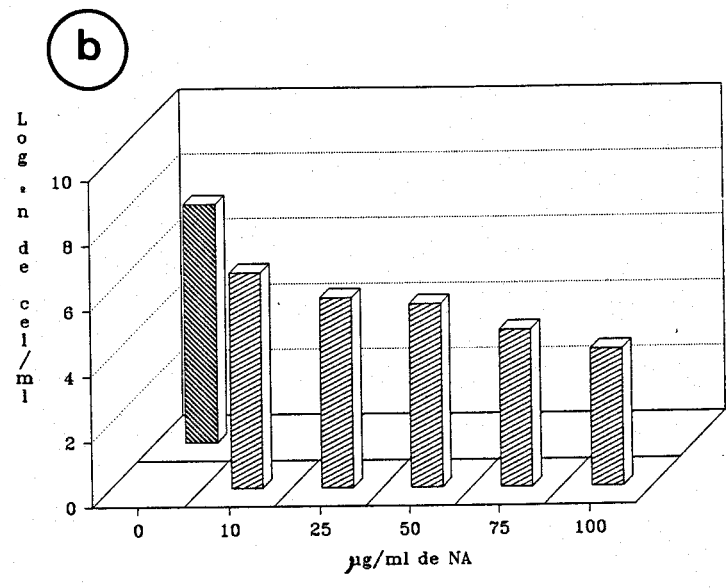
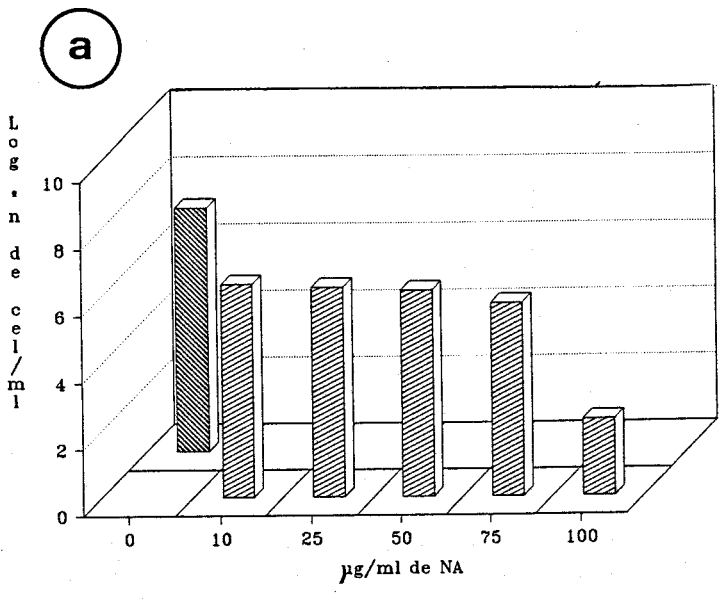


Figura 13.- Influencia de las fases de crecimiento del cultivo en la supervivencia la Naranja de Acridina de *Halococcus morrhuae*. a) fase exponencial de crecimiento, b) fase estacionaria de crecimiento.

▨ Cultivos en presencia de NA.

▩ Cultivos en ausencia de NA.



4. Influencia del pH en el efecto de la Naranja de Acridina sobre el crecimiento de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

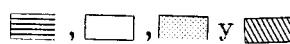
En los estudios de Silver y col. (1968), con colorantes de acridina en células de *E. coli*, observaron que hay una unión interna esencialmente irreversible, cuando las barreras de permeabilidad celular son alteradas o destruidas por tratamientos con calor, elevados valores de pH, tratamiento con determinados productos químicos o infección por bacteriófagos. Estos autores, afirman que la envoltura celular cambia su permeabilidad a la acridina por encima del rango crítico de pH, indicando que se puede deber a un aumento de la permeabilidad celular a pH alto, más que a un efecto directo del pH sobre la afinidad de unión de los colorantes a los sitios específicos.


Basándonos en estos antecedentes, se realizó el estudio de la influencia del pH en la supervivencia del cultivo bacteriano en presencia de NA.

Para ello, se estudió la supervivencia a la NA de cada una de las bacterias a distintos pHs, cultivándolas en presencia o ausencia del colorante a las concentraciones previamente determinadas, en un rango de valores de pH (6,0-8,6) que permite el óptimo crecimiento de cada bacteria. Para calcular la supervivencia se determinó el número de células a tiempo cero y a las 72 horas de incubación.

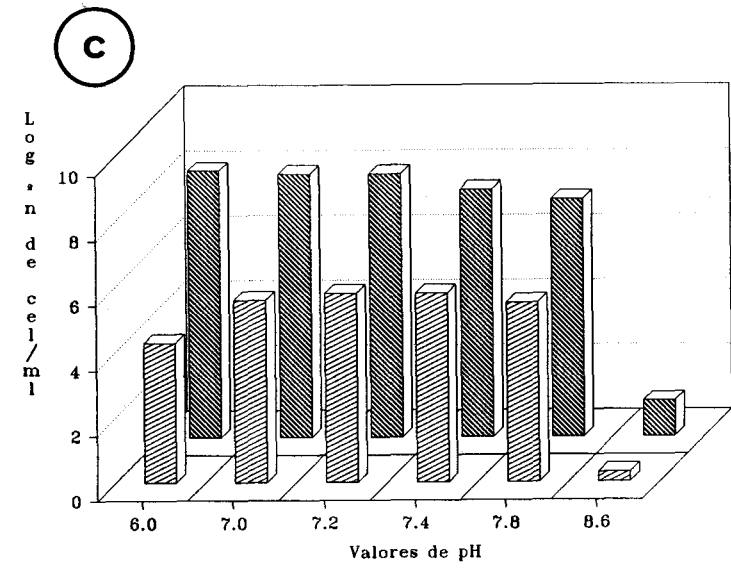
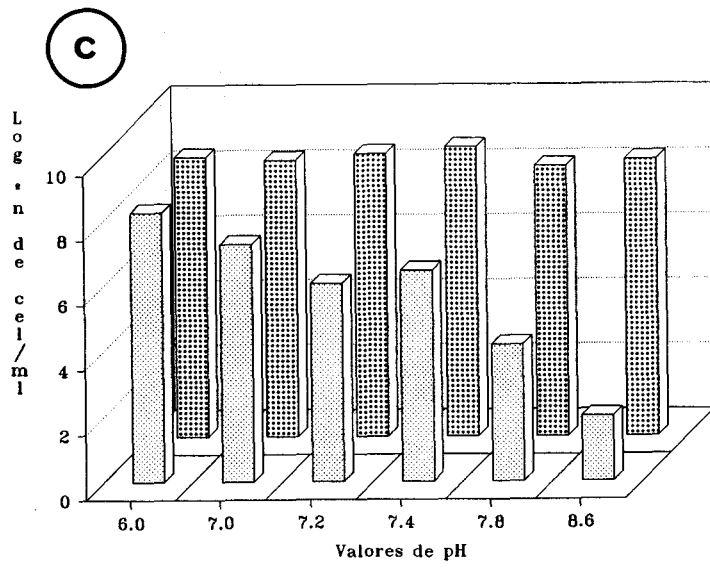
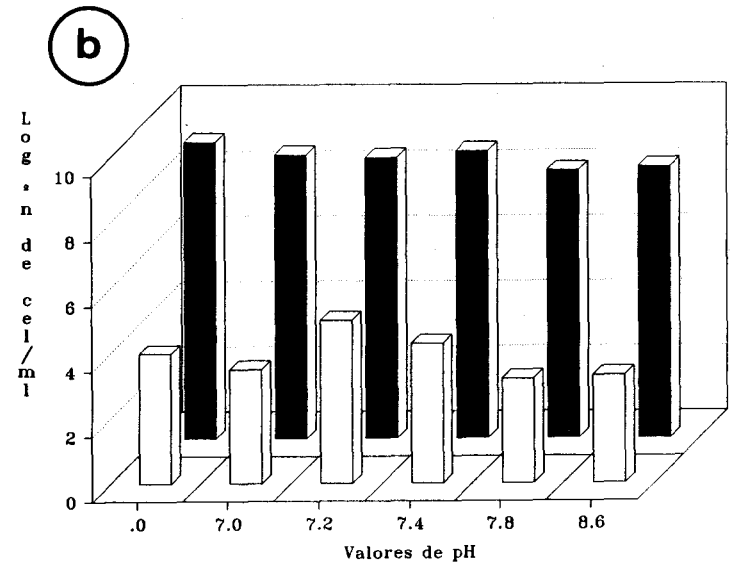
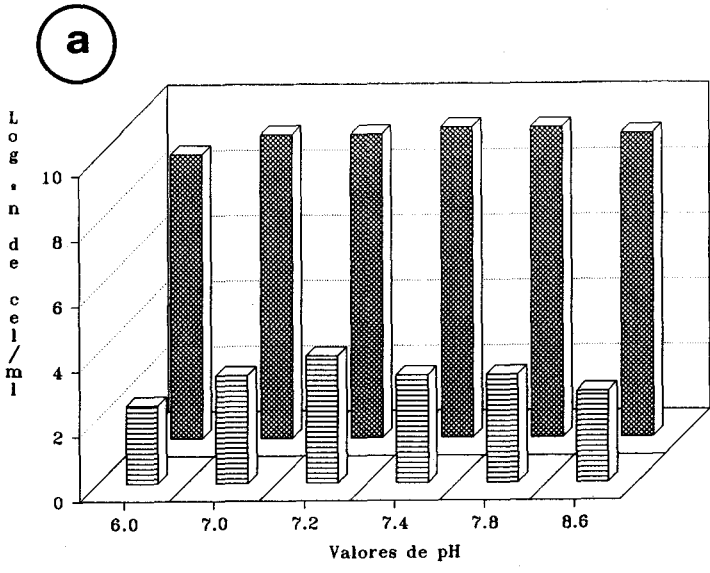
Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 14 donde se puede apreciar, que tanto *A. morrhuae* como *H. californiae* presentan un comportamiento muy parecido

Figura 14.- Influencia del pH en el crecimiento y en la supervivencia a la Naranja de Acridina de: a) *Amoebobacter morrhuae*; b) *Haloarcula californiae*; c) *Halobacterium halobium* y d) *Halococcus morrhuae*.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.





ya que ambas especies muestran igual sensibilidad al tratamiento con NA independientemente del valor de pH empleado. No obstante, hay una mayor supervivencia a valores de pH cercanos al óptimo de crecimiento (pH=7,2).

*H. morrhuae* presenta un comportamiento idéntico a las cepas anteriores, puesto que no hay diferencias significativas en cuanto a la supervivencia a diferentes pHs (independientemente de que, *H. morrhuae* no crezca o lo haga poco a valores superiores de pH 8,0) y además la supervivencia es también mayor alrededor de pH 7,2.

*H. halobium* es la única especie que presenta claras diferencias en cuanto a la supervivencia a los distintos pHs. La máxima supervivencia se alcanza a pH 6,0, descendiendo a medida que aumenta el pH, hasta alcanzarse el valor mínimo a pH 8,6.

Ninguna de las especies estudiadas presenta un comportamiento similar al que indica Barker (1978), para *E. coli* cepa K12 donde la mayor inhibición se produce a pH próximo al óptimo de crecimiento.

##### 5. Influencia de la Naranja de Acridina en el crecimiento de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae* con distintas concentraciones de sales

Para comprobar si la concentración de sal puede influir en la supervivencia de los microorganismos en presencia de NA, se hicieron cultivos de las células en medio líquido a 15, 20, 25 y 30% de sales totales con y sin NA (a una

concentración dada), realizando recuentos del número de células a lo largo del tiempo.


En la Figura 16, se observan los valores de la supervivencia de *H. californiae* en las mencionadas condiciones comprobando que la NA afecta profundamente a este microorganismo cuando la concentración de sales es del 15, 20 y 30%, siendo más acentuado al 15%.


Para los otros tres microorganismos, el efecto de la concentración de sales en la supervivencia a la NA casi no varía como puede observarse en las Figuras 15, 17 y 18, ya que si bien, a 15% de concentración la influencia de la NA es mayor, ésta no es notable, siendo mínima a las concentraciones de 20 y 30%. La concentración del 25%, prácticamente no afecta a ninguno de los microorganismos estudiados.

Paralelamente se realizó un estudio en placa a las mismas concentraciones de sales y diferentes concentraciones de NA (25, 50 y 75 ug/ml) para *H. californiae*, *H. halobium* y *A. morrhuae* y además de 100 ug/ml para *H. morrhuae* observándose que *H. californiae*, *H. halobium* y *A. morrhuae* tuvieron crecimiento al 20 y 25% de sales en todas las concentraciones de NA y que *H. morrhuae* tuvo crecimiento al 15, 20 y 25% de sales a todas las concentraciones de NA.

Dado que a concentraciones de sales diferentes a la óptima se alteran las cargas iónicas de la membrana citoplasmática y que la NA se une a receptores específicos relacionados con la carga iónica, podría explicarse por este

Figura 15.- Influencia de la concentración de sales en la supervivencia de *Amoebobacter morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina. a) medio SW-15 (15% de sales), b) medio SW-20 (20% de sales), c) medio SW-25 (25% de sales) y d) medio SW-30 (30% de sales).

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

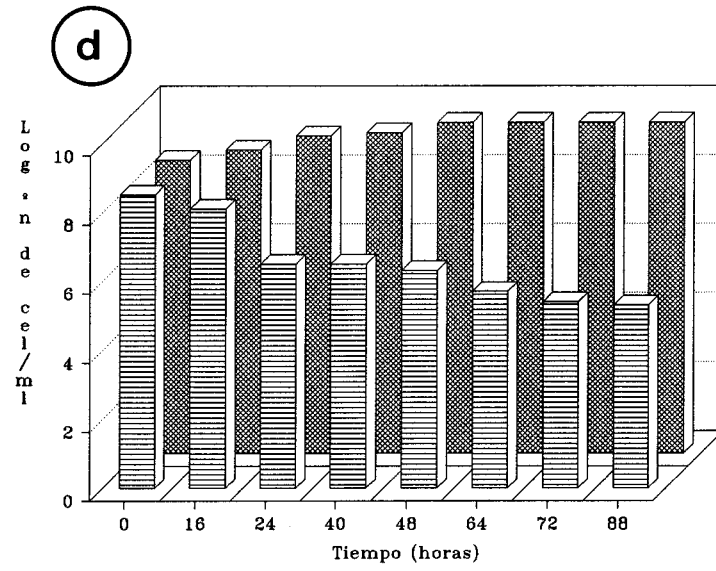
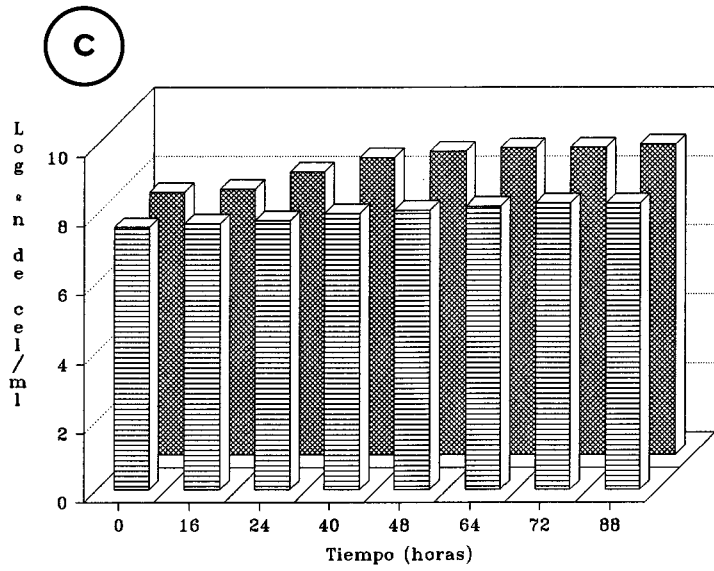
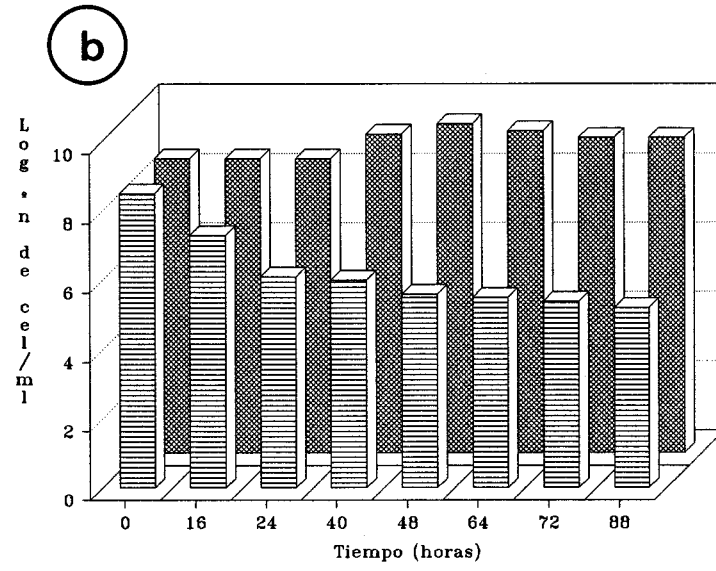
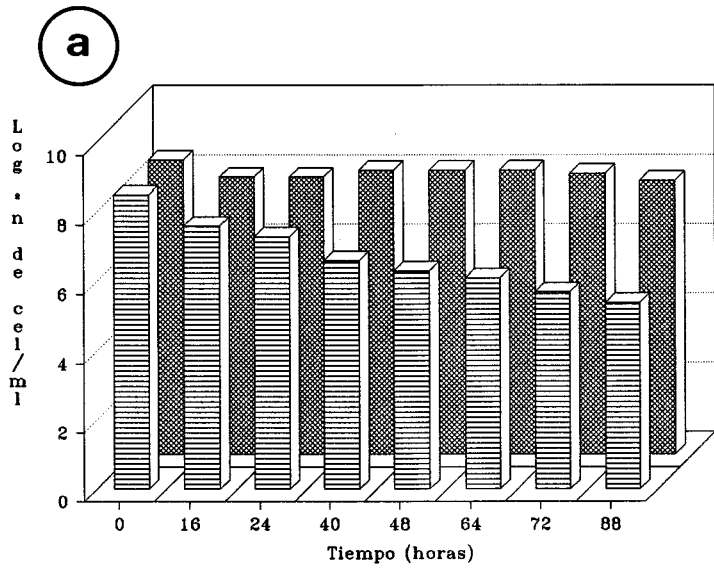


Figura 16.- Influencia de la concentración de sales en la supervivencia de *Haloarcula californiae* en presencia a la Naranja de Acridina. a) medio SW-15 (15% de sales), b) medio SW-20 (20% de sales), c) medio SW-25 (25% de sales) y d) medio SW-30 (30% de sales).

□ Cultivos en presencia de NA.

■ Cultivos en ausencia de NA.

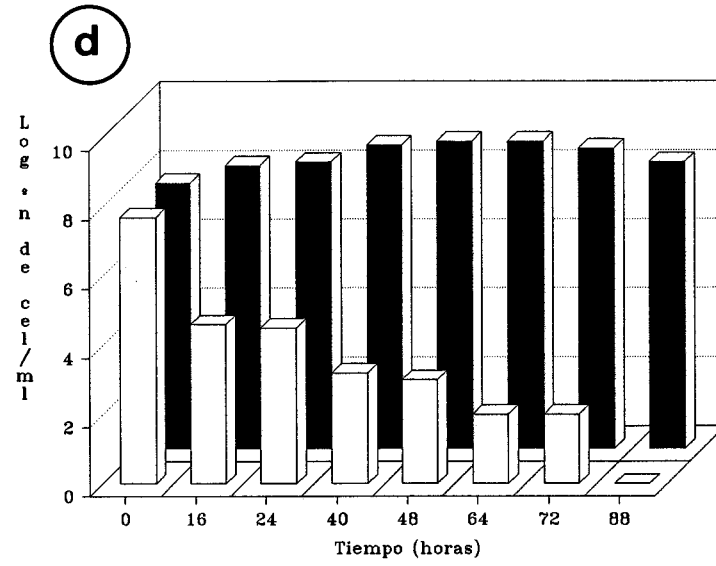
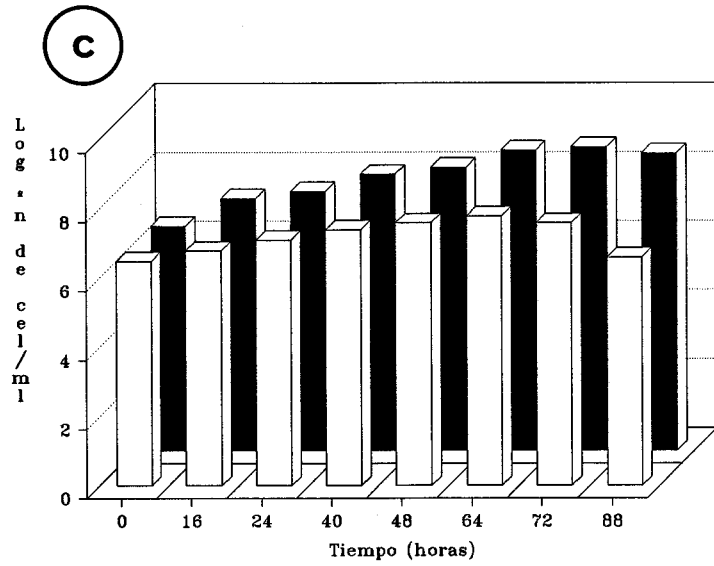
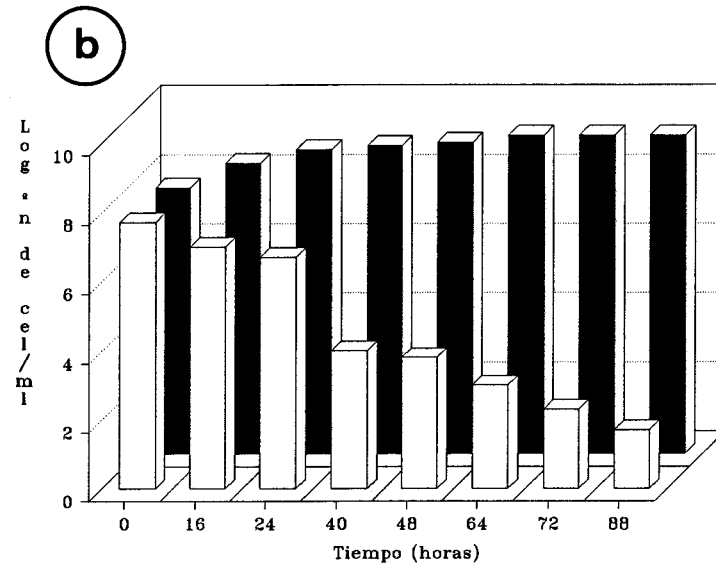
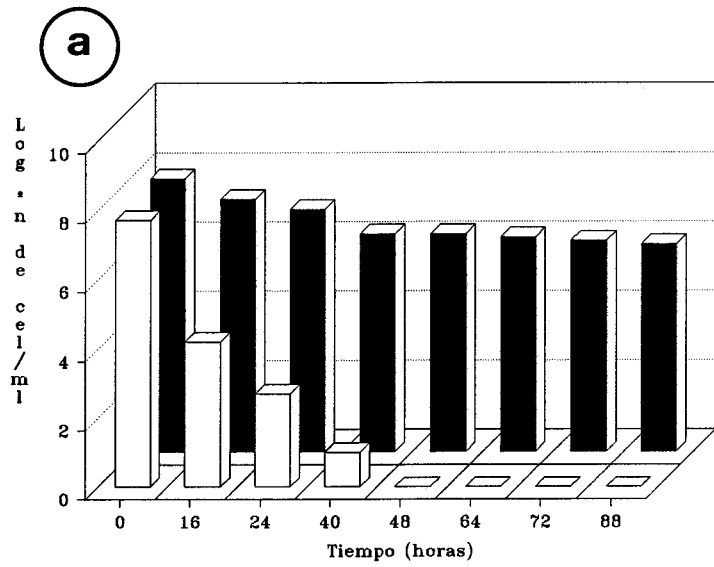




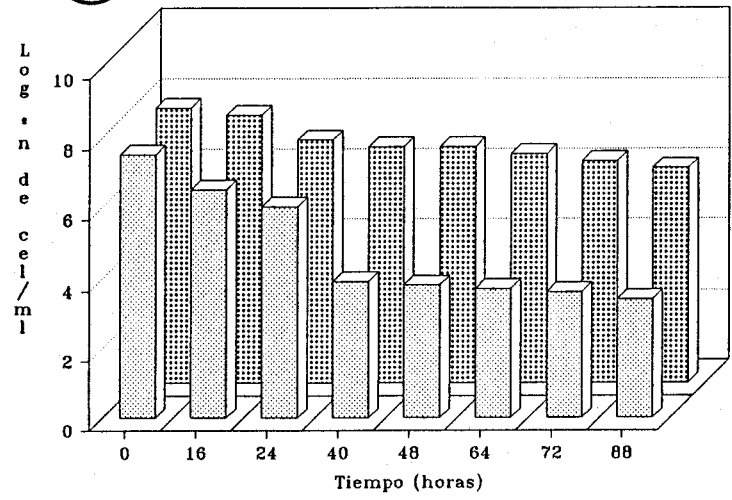
Figura 17.- Influencia de la concentración de sales en la supervivencia de *Halobacterium halobium* en presencia de Naranja de Acridina. a) medio SW-15 (15% de sales), b) medio SW-20 (20% de sales), c) medio SW-25 (25% de sales) y d) medio SW-30 (30% de sales).

 Cultivos en presencia de NA.

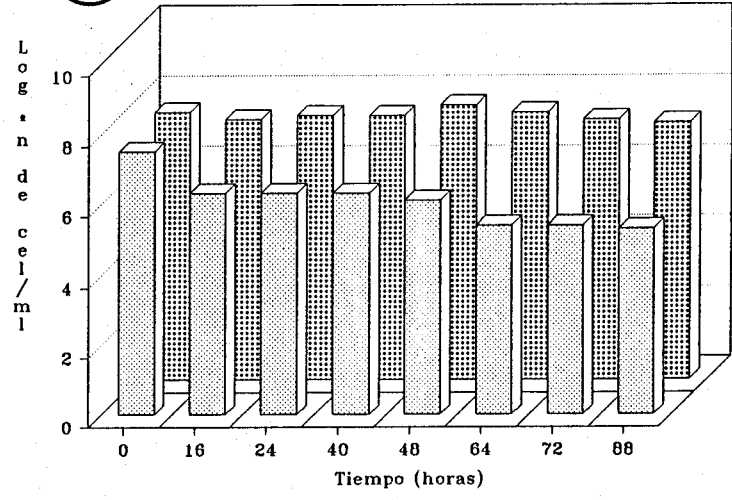
 Cultivos en ausencia de NA.



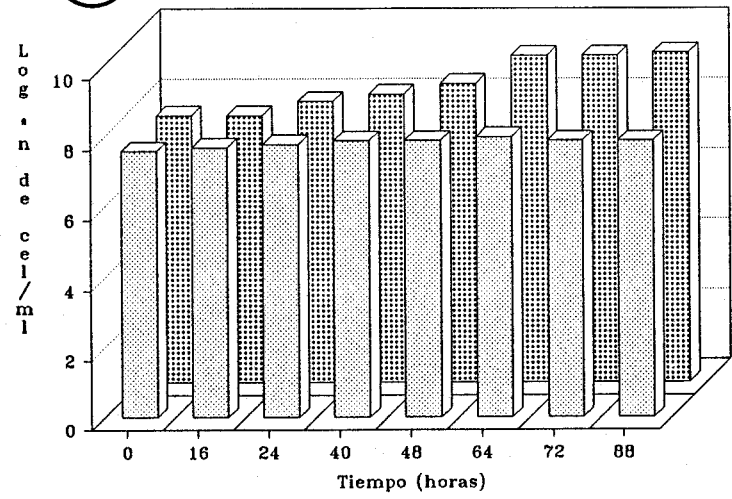
(a)



(b)



(c)



(d)

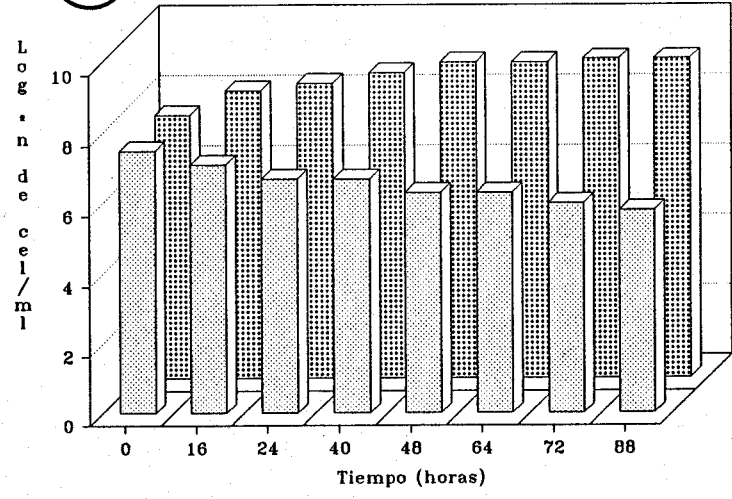


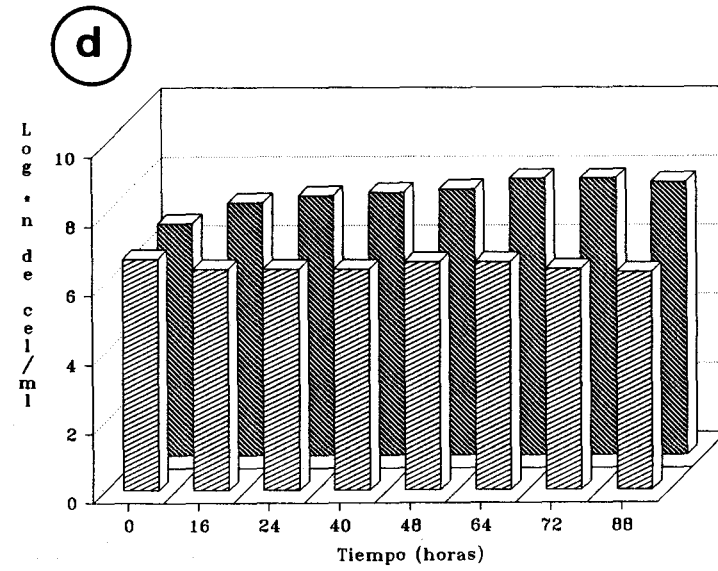
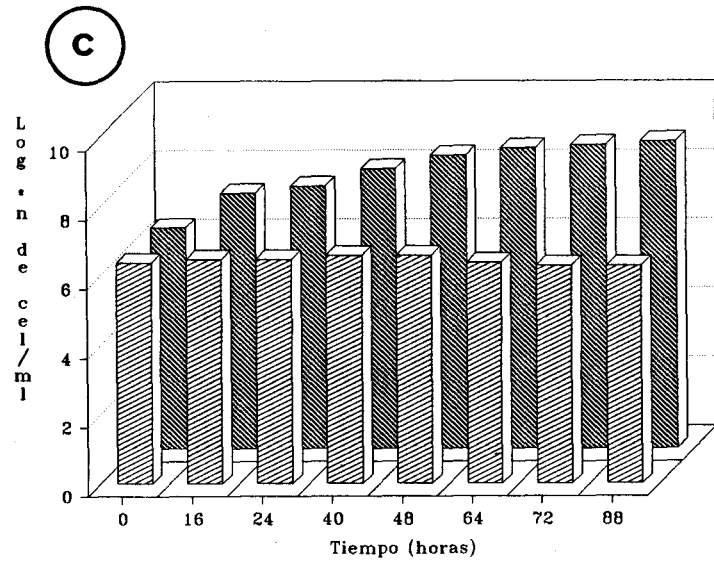
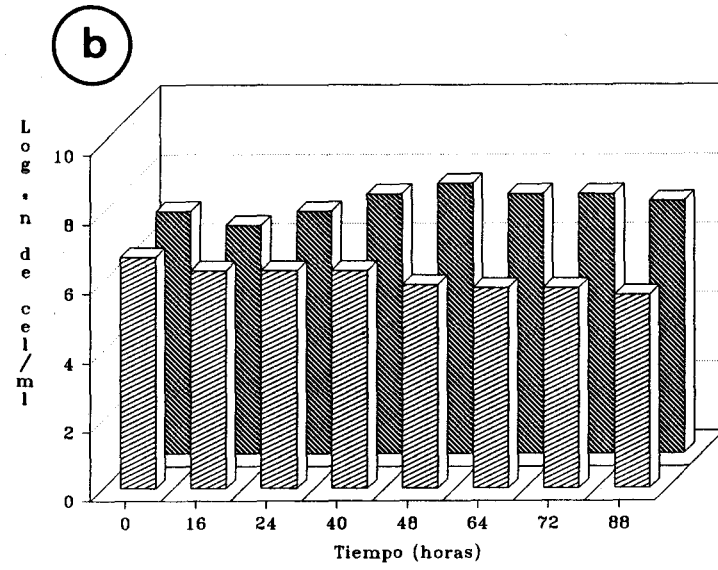
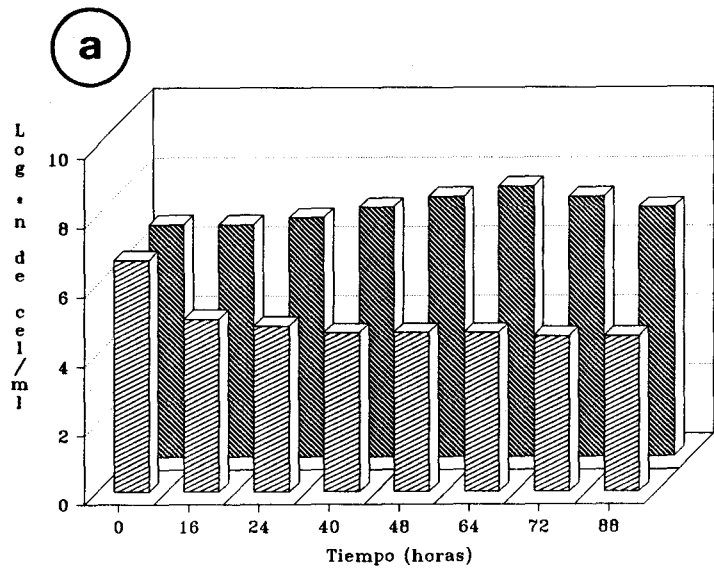


Figura 18.- Influencia de la concentración de sales en la supervivencia de *Halococcus morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina. a) medio SW-15 (15% de sales), b) medio SW-20 (20% de sales), c) medio Sw-25 (25 % de sales) y d) medio SW-30 (30% de sales).

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.



mecanismo el efecto de potenciación de la NA en *H. californiae* a concentraciones diferentes a la óptima y en *A. morrhuae* y *H. halobium* aunque el efecto no sea tan pronunciado.

De los resultados obtenidos para *H. morrhuae* se deduce que la carga iónica de la pared celular difiere mucho de la de las otras tres especies.

6. Influencia del fosfato en el crecimiento y supervivencia a la Naranja de Acridina de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Nakamura y col. (1975), manifiestan que la NA junto con el fosfato inorgánico producen un efecto sinérgico en la sensibilidad de algunas células de *E. coli*. Afirmando que este efecto estimulante del fosfato sobre la acridina puede ser debido a la formación de un complejo entre el grupo catiónico de la acridina y del grupo aniónico del  $PO_4^{3-}$ .

Por ello, se realizó un estudio comparativo con las cuatro especies utilizando fosfato mono y dipotásico a distintas molaridades y a una concentración determinada de NA.

Para determinar si el fosfato puede influir en el tiempo que permanecen viables las células en presencia de NA, un inóculo de cada una de las bacterias estudiadas se resuspendió tanto en solución de fosfato monopotásico como en solución de fosfato dipotásico, a las siguientes concentraciones, (0,5; 1; 10; 50 y 100mM) con y sin adición de NA, y realizando el recuento del número de células a

tiempo cero, tres y seis horas después de la inoculación.


En las Figuras 19, 20, 21 y 22 se muestran los resultados obtenidos. *H. morrhuae* no se ve afectada por el tipo de fosfato, ni la concentración utilizada, ni por el tiempo de incubación de las células, ya que el número de células permanece constante con los diferentes tratamientos.


Igualmente, *A. morrhuae* y *H. halobium*, cuando se ponen en contacto con fosfato monopotásico muestran un comportamiento similar al de *H. morrhuae*. Sin embargo, en presencia de fosfato dipotásico, la supervivencia es sensiblemente menor en ambos casos a medida que aumenta la concentración del fosfato, y se acentúa cuando el recuento de células se realiza a las seis horas, siendo máximo en ambas cepas cuando la concentración de fosfato es 100mM.

Por otra parte *H. californiae* sigue la misma pauta que las cepas anteriores cuando el tratamiento se realiza con fosfato monopotásico, aunque es susceptible su viabilidad a concentraciones mayores de 10mM. Ahora bien, cuando el tratamiento se realiza con fosfato dipotásico, existen variaciones muy significativas a concentraciones superiores de 50 mM, ya que tanto a 3 como a 6 horas, se inhibe el crecimiento de las células en presencia de NA.

Nakamura y col. (1975), indican que para *E. coli*, concentraciones de fosfato superiores a 10mM influyen drásticamente en la supervivencia a la NA, siendo un comportamiento similar a los resultados que presenta *H. californiae*. Esta especie además del efecto de la NA, ha

Figura 19.- Influencia de la concentración de fosfato monopotásico (a y c) y dipotásico (b y d) en la viabilidad de *Amoebobacter morrhuae*: (a y b) 3 horas de incubación y (c y d) 6 horas de incubación.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

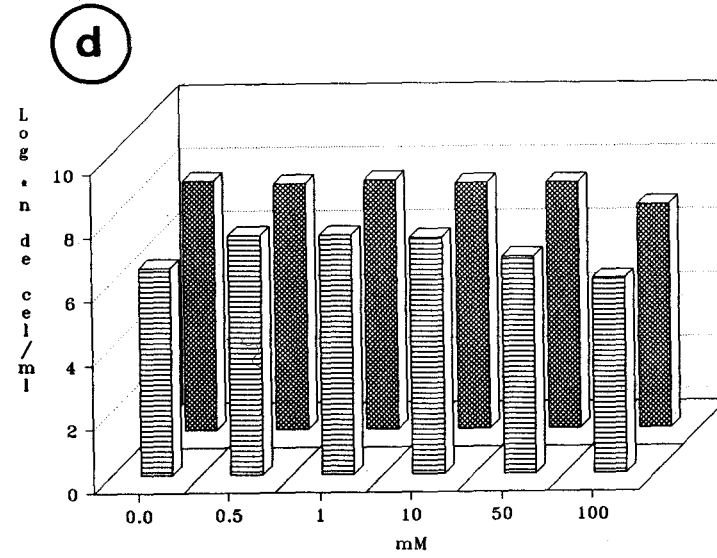
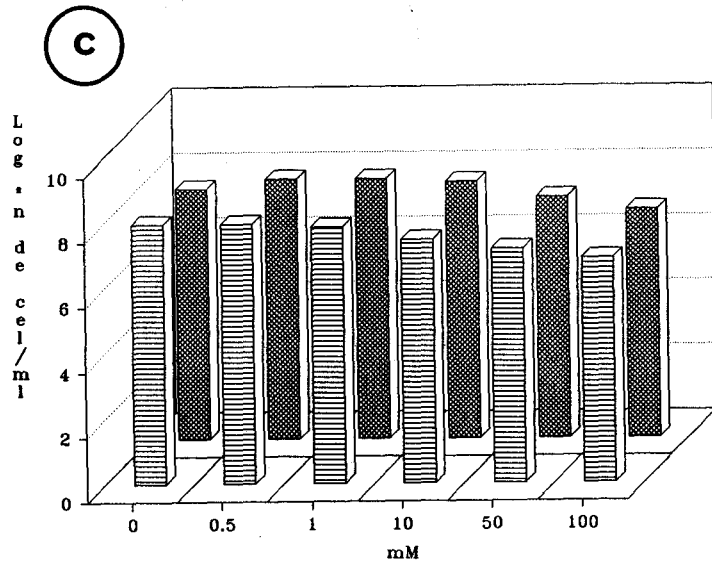
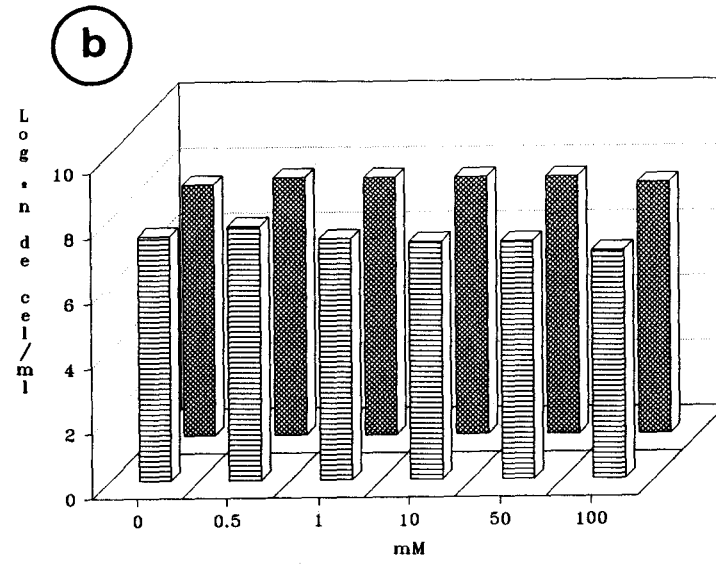
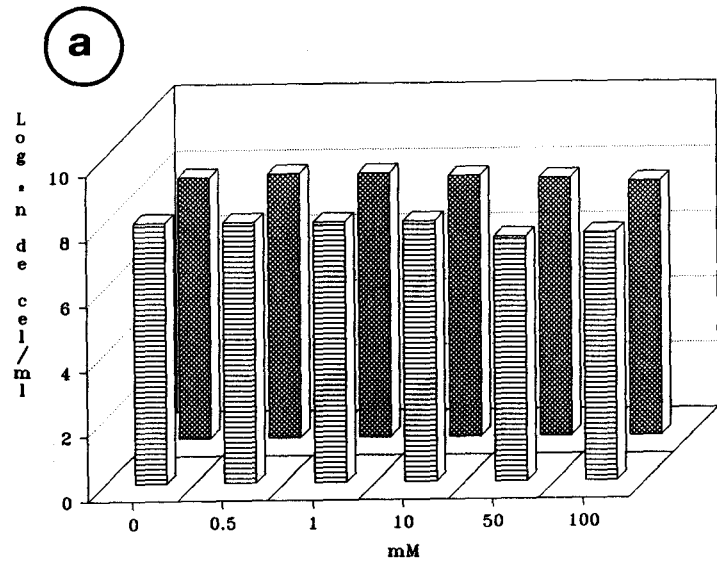


Figura 20.- Influencia de la concentración de fosfato monopotásico (a y c) y dipotásico (b y d) en la viabilidad de *Haloarcula californiae*: (a y b) 3 horas de incubación y (c y d) 6 horas de incubación.

Cultivos en presencia de NA.

Cultivos en ausencia de NA.



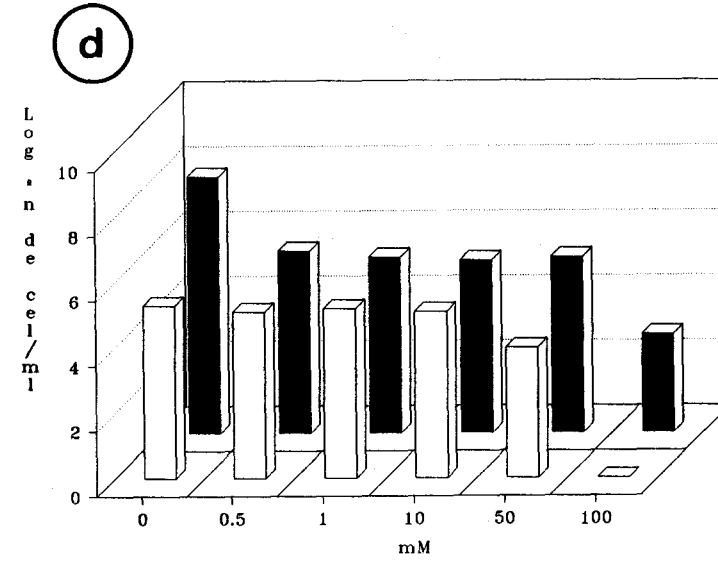
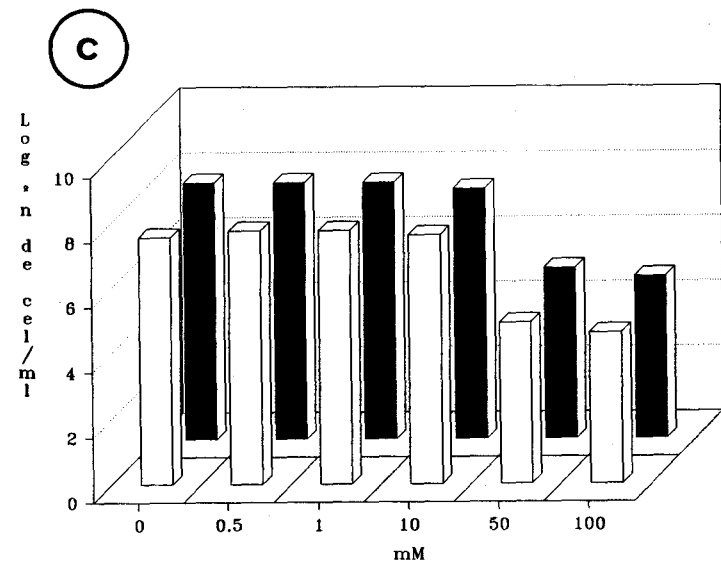
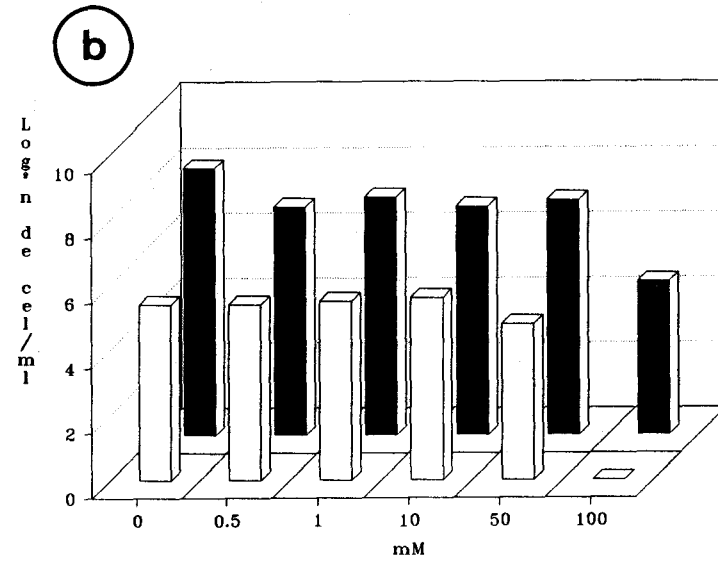
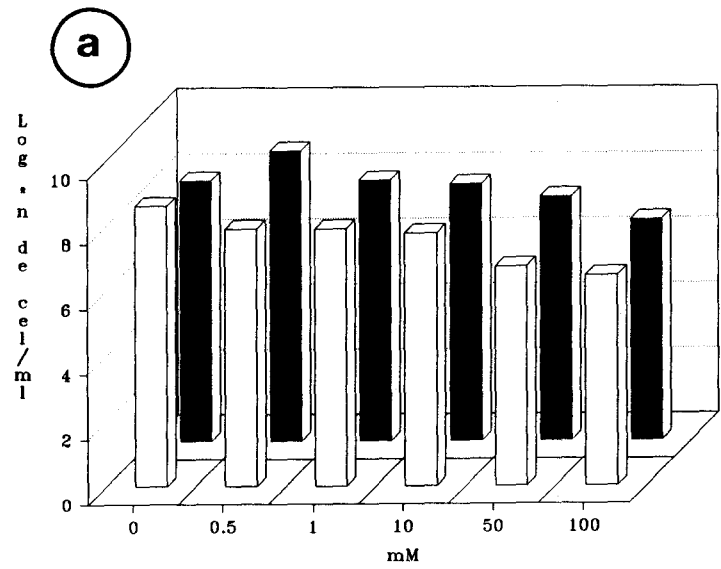




Figura 21.- Influencia de la concentración de fosfato monopotásico (a y c) y dipotásico (b y d) en la viabilidad de *Halobacterium halobium*: (a y b) 3 horas de incubación y (c y d) 6 horas de incubación.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

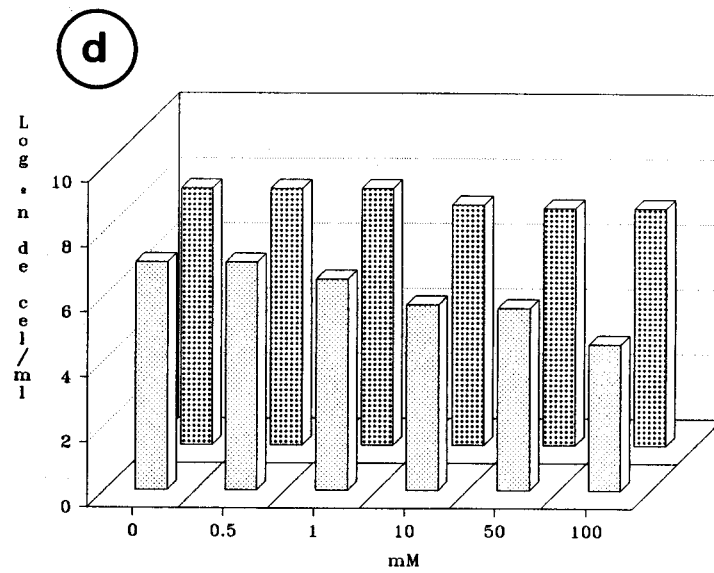
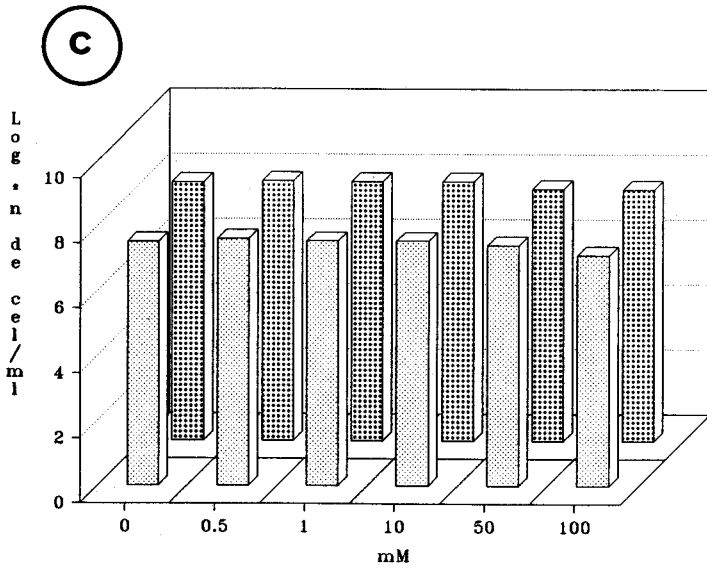
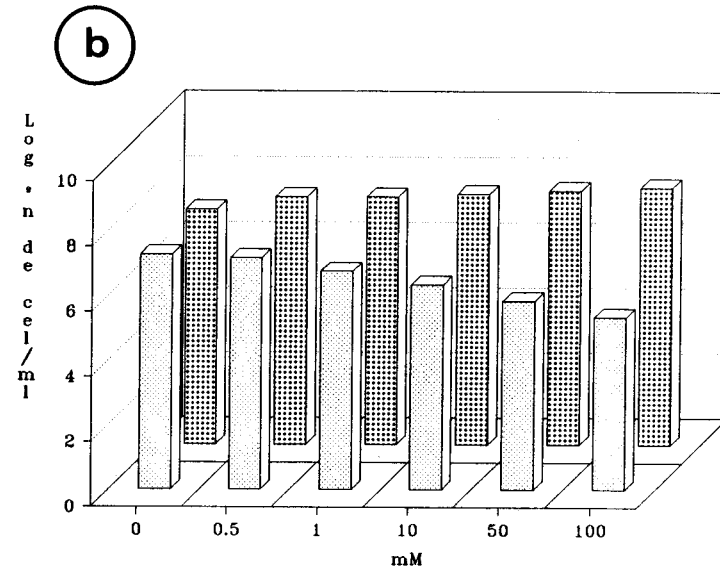
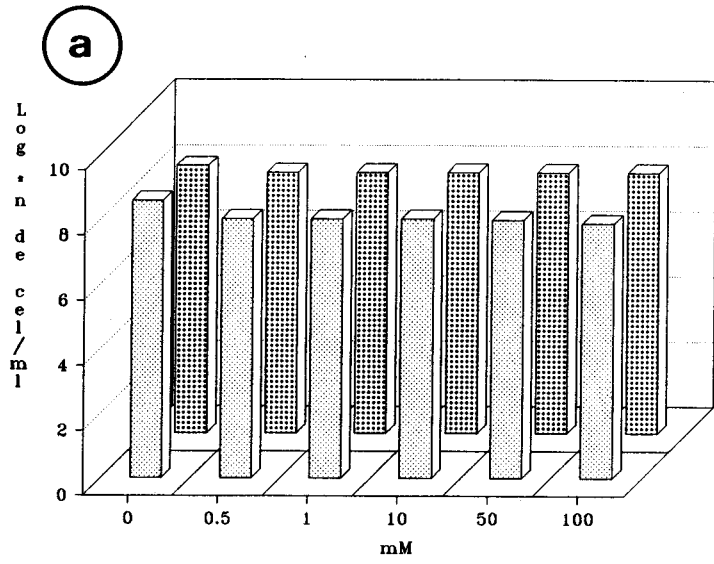


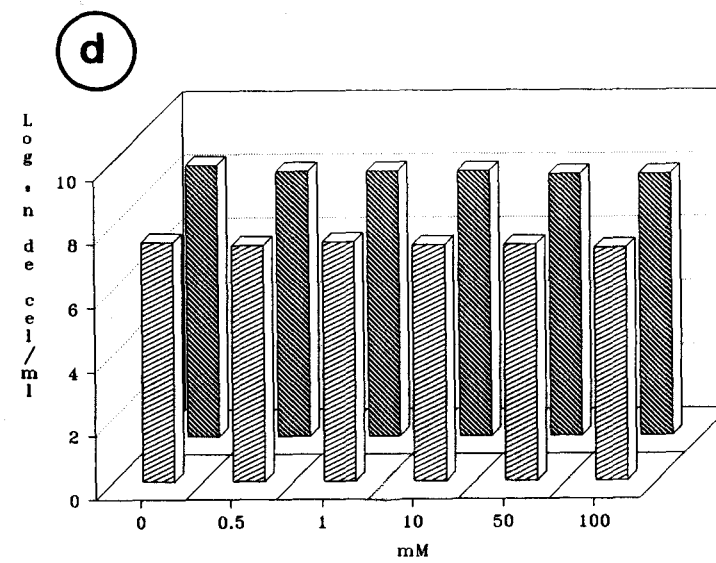
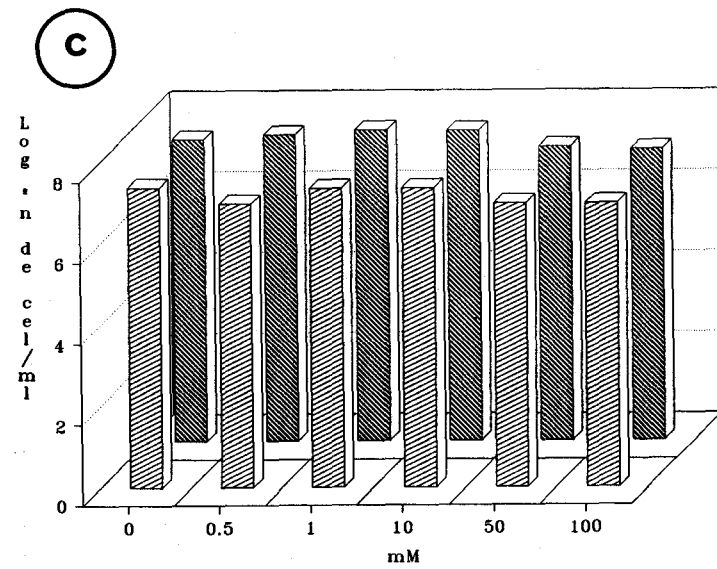
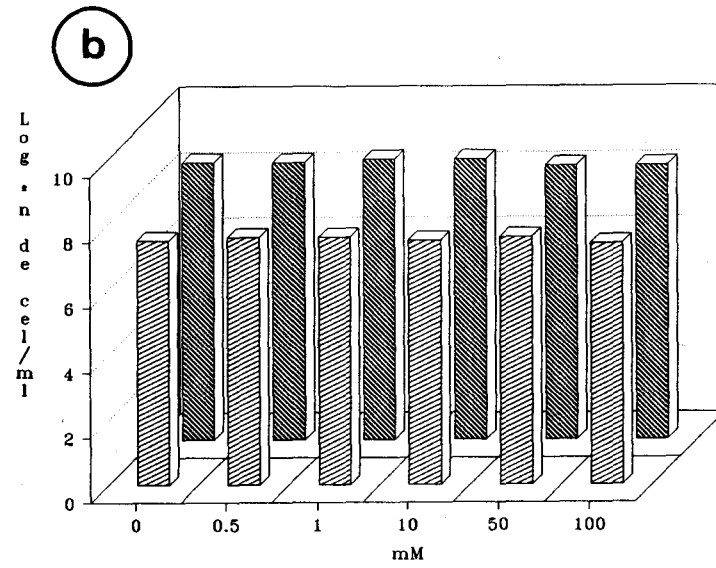
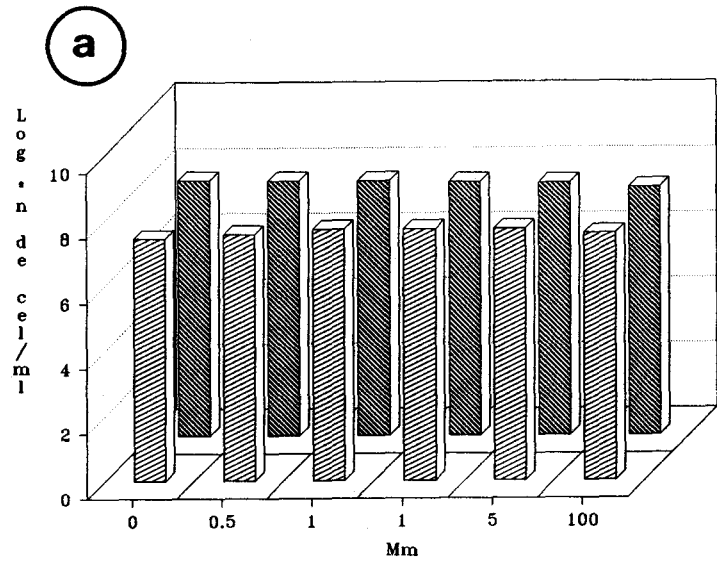


Figura 22.- Influencia de la concentración de fosfato monopotásico (a y c) y dipotásico (b y d) en la viabilidad de *Halococcus morrhuae*: (a y b) 3 horas de incubación y (c y d) 6 horas de incubación.

-  Cultivos en presencia de NA.
-  Cultivos en ausencia de NA.



resultado ser muy sensible a los fosfatos, disminuyendo la supervivencia normal de las células, quizás por ello, sea la especie más afectada por la NA.

#### 7. Influencia de la concentración de glucosa sobre el efecto de la Naranja de Acridina en cultivos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Los estudios de Nakamura (1967), indican que cuando *E. coli* se cultiva en medios con glucosa son menos sensibles a la acridina, debido a que la capacidad de unión de ésta con la bacteria es afectada por la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo, independientemente del valor del pH.

Basándonos en estos trabajos, se ha estudiado la posible influencia de la glucosa sobre el efecto de la NA en los microorganismos en estudio. Para ello, se han utilizado concentraciones de glucosa de 0 a 5 g/l a pH inicial de 7,2 y una concentración fija de NA para cada especie.

En primer lugar, en las Figuras 23a, 24a, 25a, y 26a, se estudia la supervivencia a la NA a distintas concentraciones de glucosa, utilizando en uno de los supuestos (0,5+Tris), un tampón para controlar la posible variación del pH por el consumo de glucosa. Se observa que, la supervivencia de las células, si bien es menor en los cultivos crecidos en presencia de NA, no es afectada por la glucosa inicial del medio de cultivo, ya que ésta es prácticamente igual para todas las concentraciones de glucosa e incluso en el caso del

control sin glucosa.

En las Figuras 23b, 24b, 25b y 26b se estudia el consumo de glucosa de los cultivos anteriores y se observa que el consumo de glucosa es siempre menor en presencia de NA, siendo la diferencia más acusada en el caso de *H. californiae* donde además a altas concentraciones de glucosa se produce un menor consumo de la misma.

Esto puede ser debido a que el número de células crecidas en presencia de NA, es inferior al crecido en los cultivos sin ella, reflejándose en el consumo de glucosa.



En segundo lugar, se estudia la influencia del extracto de levadura en el consumo de glucosa y sobre el efecto de la NA en cultivos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

En las Figuras 27, 28, 29 y 30 se muestra la concentración final de glucosa en medios conteniendo distintas concentraciones de extracto de levadura y en presencia de NA.

Se observa que conforme aumenta la concentración de extracto de levadura, aumenta el consumo de glucosa, presentando *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*, un comportamiento similar, y *A. morrhuae* mantiene niveles de consumo de glucosa inferior a las otras especies, a concentraciones de extracto de levadura menor de 0,5%.

En las Figuras 31, 32, 33 y 34 se estudia la concentración final de NA después de la incubación de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*, en

Figura 23.- Estudio de la supervivencia al tratamiento con Naranja de Acridina a) y consumo de glucosa b) de cultivos de *Amoebobacter morrhuae* en medios con distintas concentraciones de glucosa.

-  Cultivos en presencia de NA.
-  Cultivos en ausencia de NA.



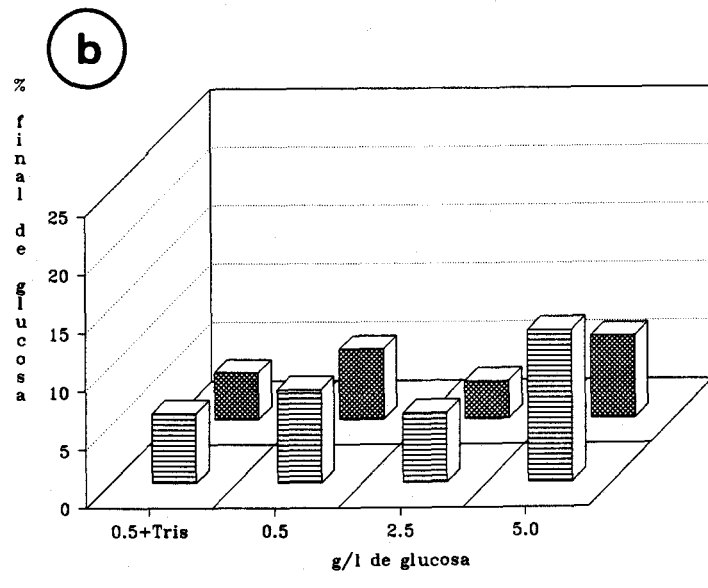
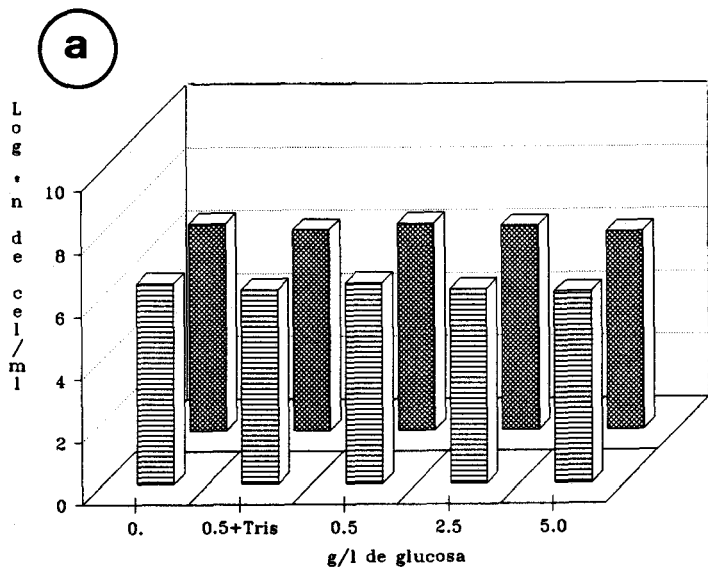


Figura 24.- Estudio de la supervivencia al tratamiento con Naranja de Acridina a) y consumo de glucosa b) de cultivos de *Haloarcula californiae* en medios con distintas concentraciones de glucosa.

□ Cultivos en presencia de NA.

■ Cultivos en ausencia de NA.

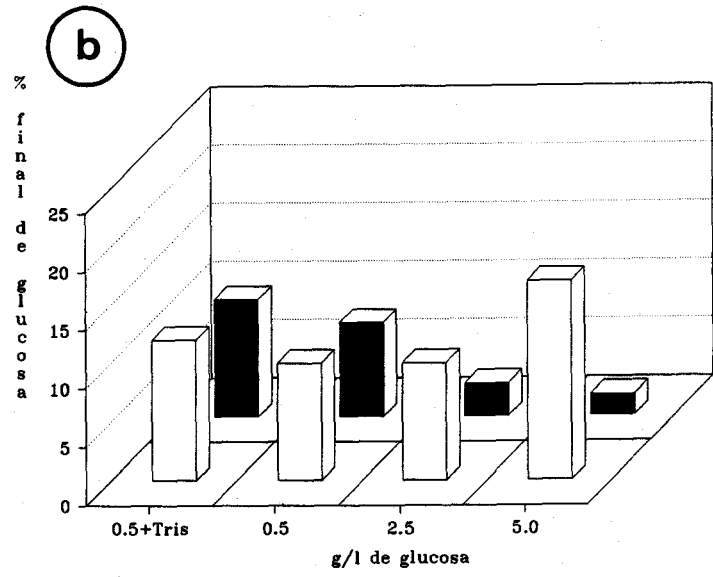
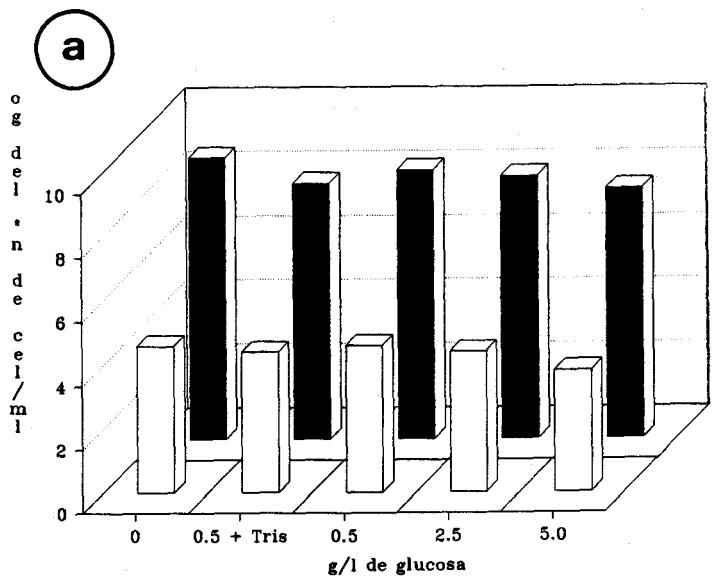


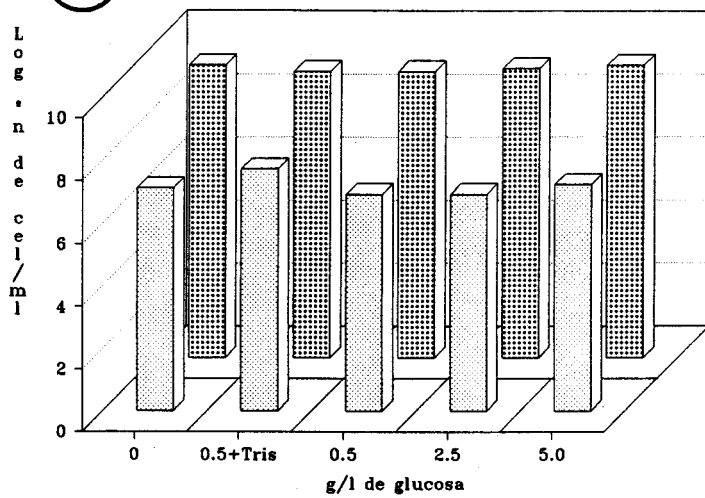


Figura 25.- Estudio de la supervivencia al tratamiento con Naranja de Acridina a) y consumo de glucosa b) de cultivos de *Halobacterium halobium* en medios con distintas concentraciones de glucosa.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

**a**



**b**

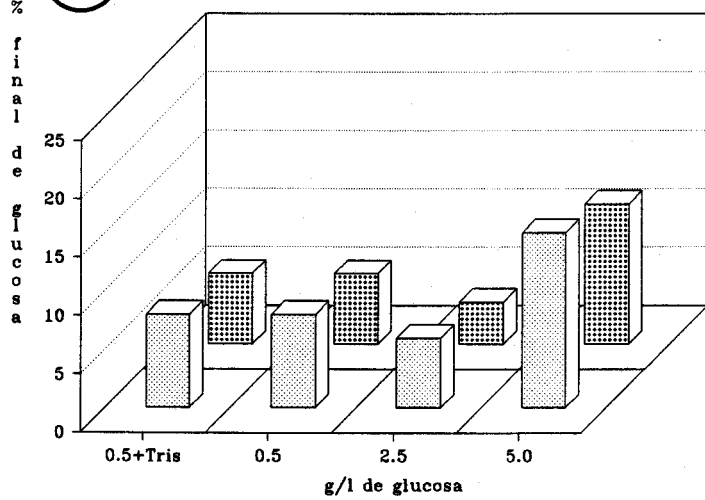




Figura 26.- Estudio de la supervivencia al tratamiento con Naranja de Acridina a) y consumo de glucosa b) de cultivos de *Halococcus morrhuae* en medios con distintas concentraciones de glucosa.

 Cultivos en presencia de NA.

 Cultivos en ausencia de NA.

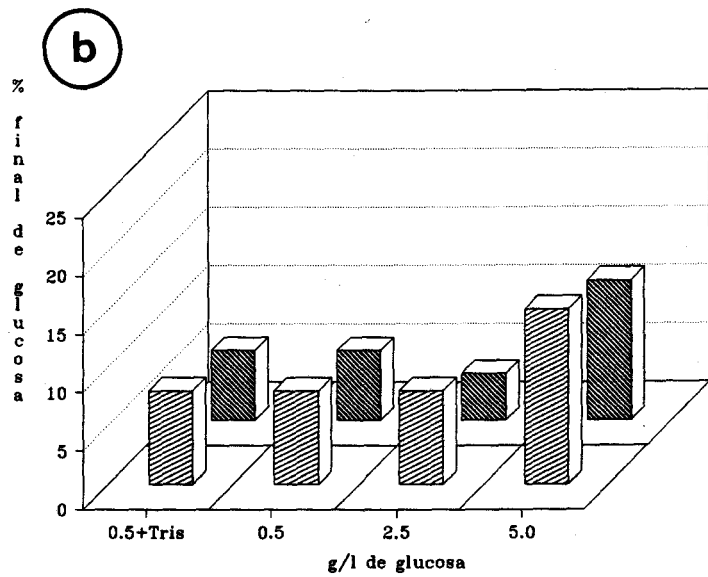
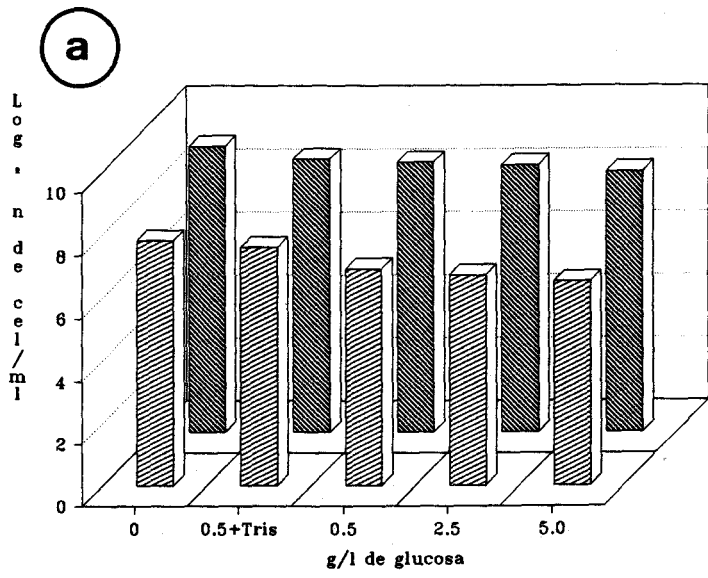


Figura 27.- Estudio del consumo de glucosa en cultivos de *Amoebobacter morrhuae* a distintas concentraciones iniciales de glucosa, en presencia de Naranja de Acridina (50 µg/ml) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.



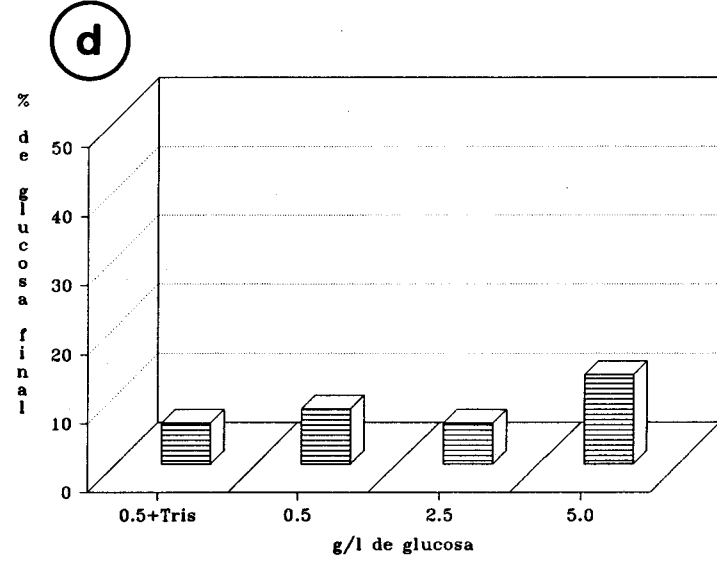
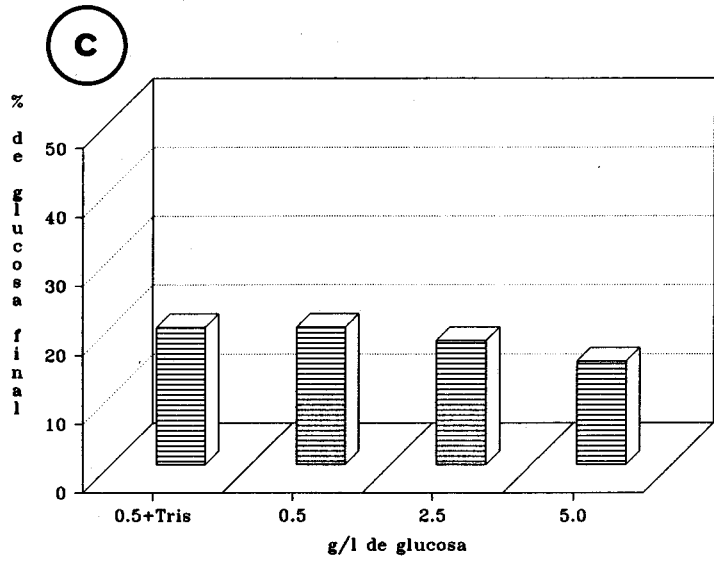
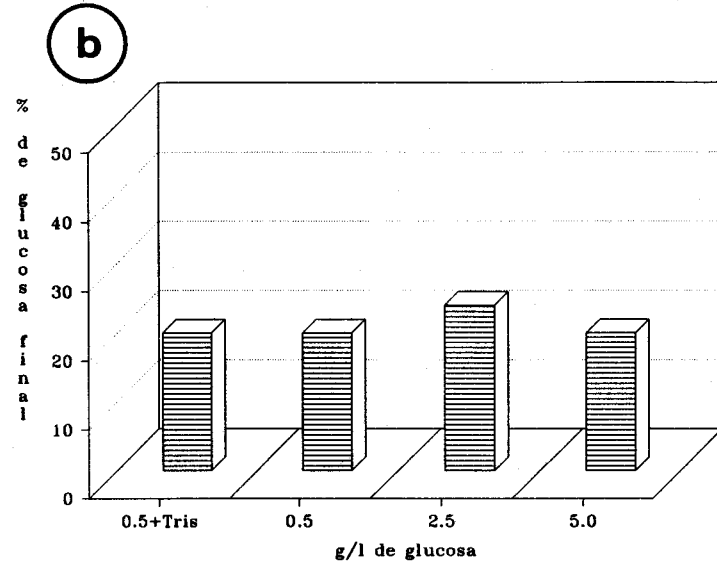
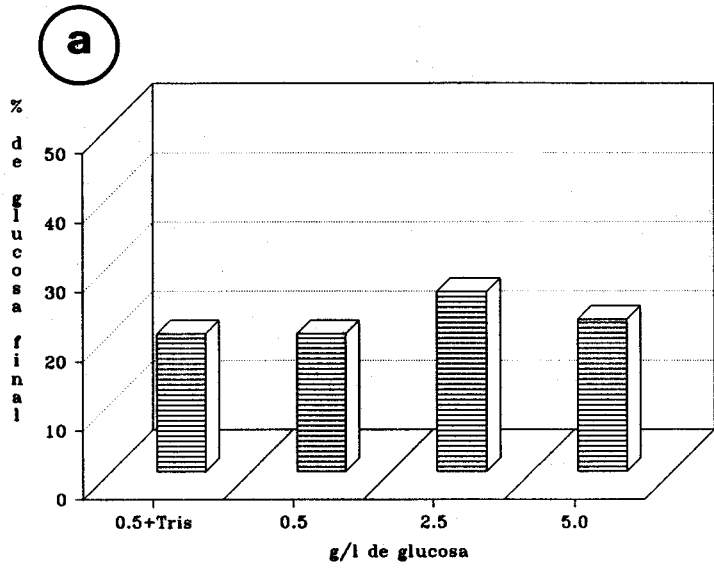


Figura 28.- Estudio del consumo de glucosa en cultivos de *Haloarcula californiae* a distintas concentraciones iniciales de glucosa en presencia de Naranja de Acridina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.

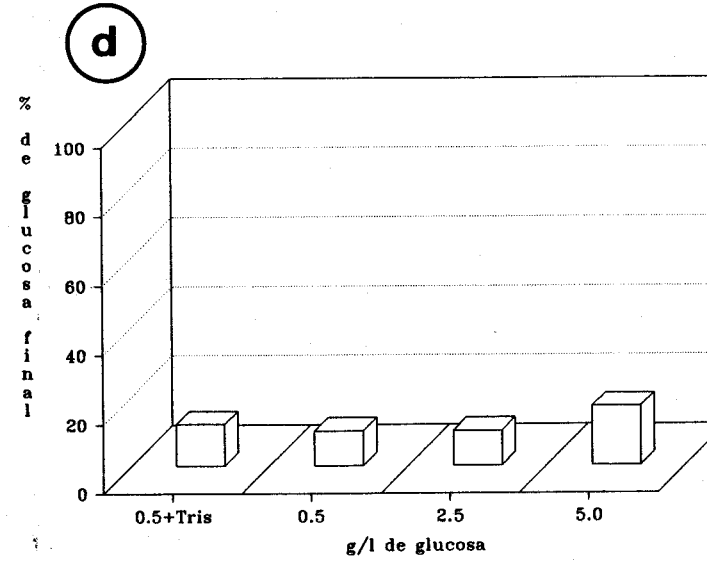
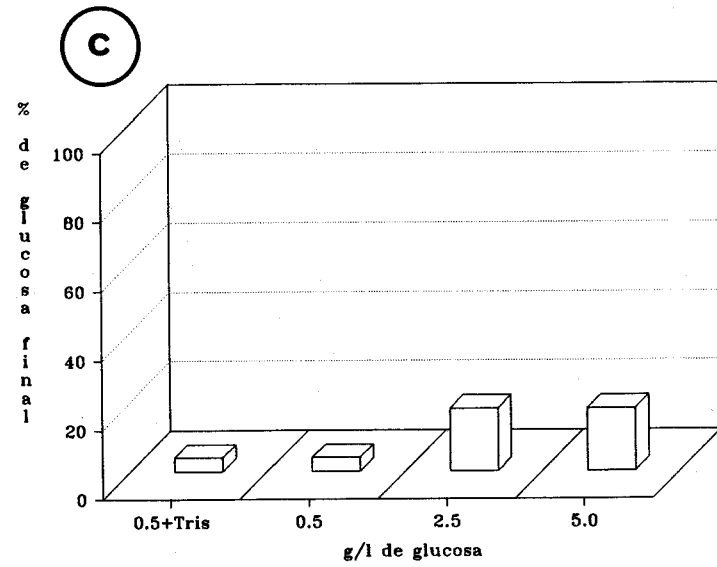
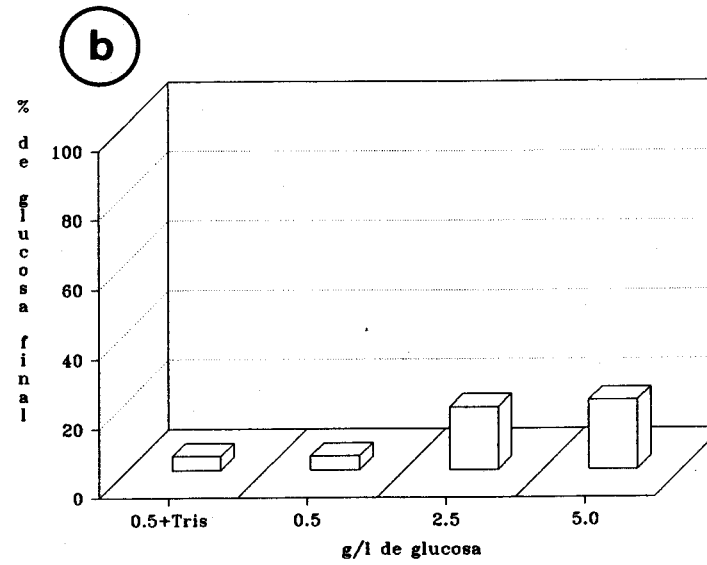
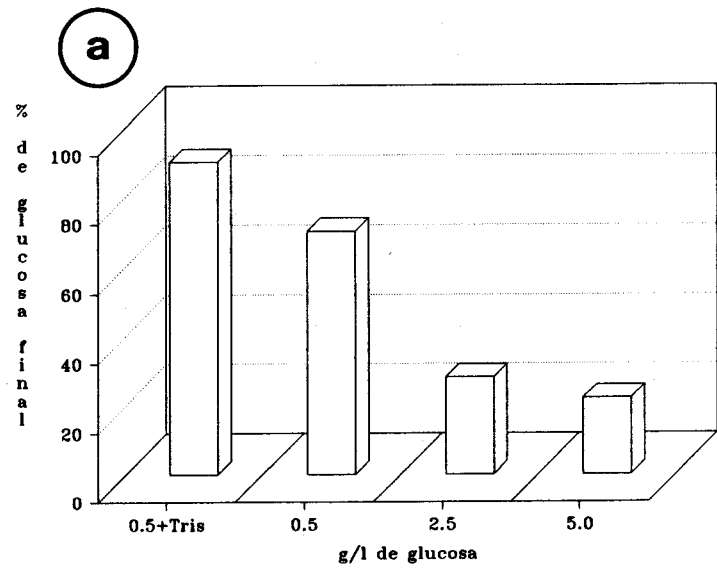


Figura 29.- Estudio del consumo de glucosa en cultivos de *Halobacterium halobium* a distintas concentraciones iniciales de glucosa, en presencia de Naranja de Acridina (50 µg/ml) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.

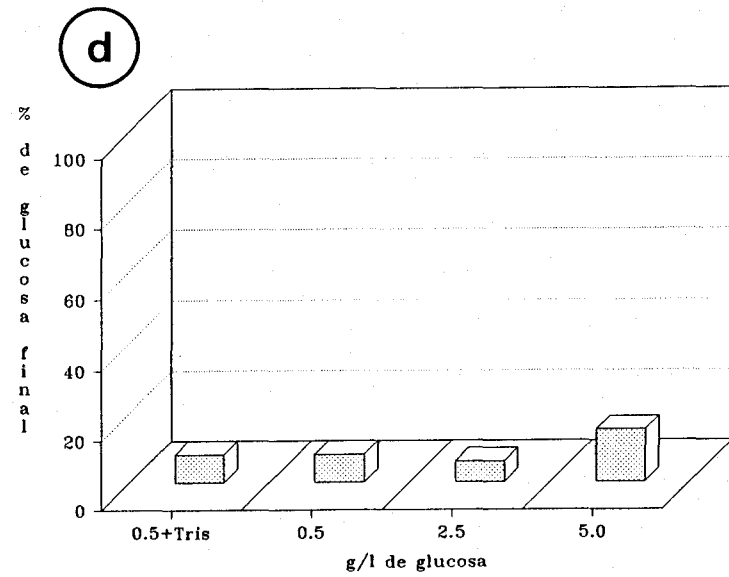
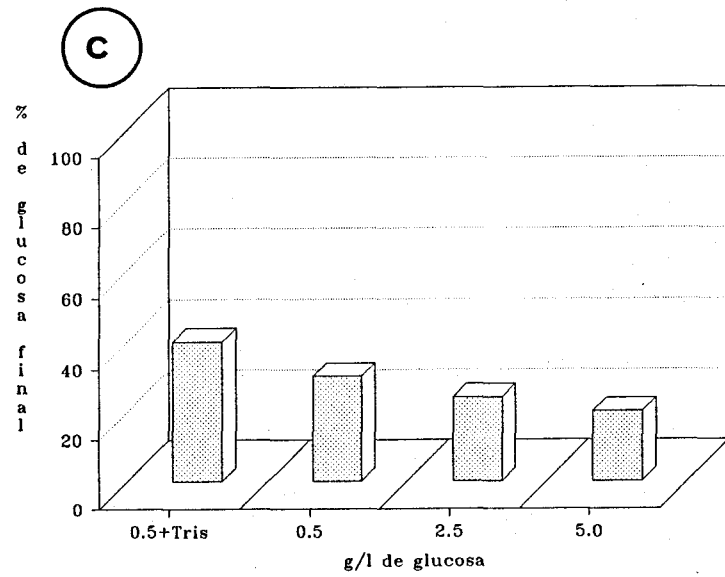
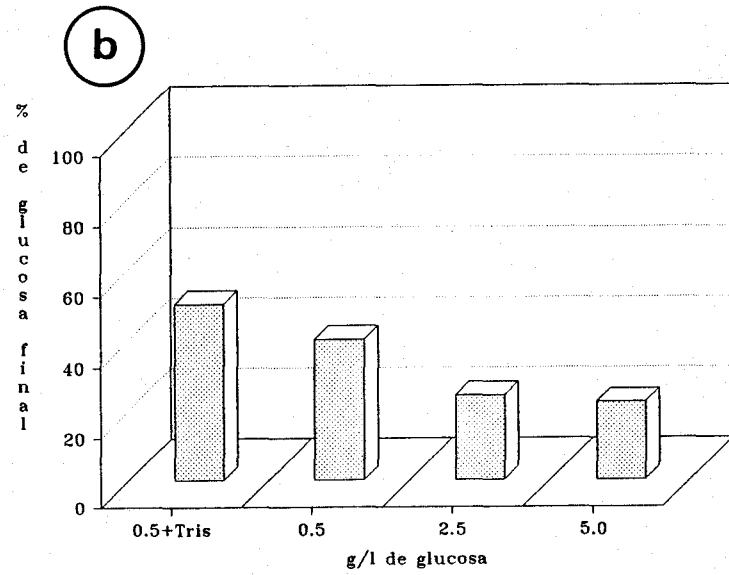
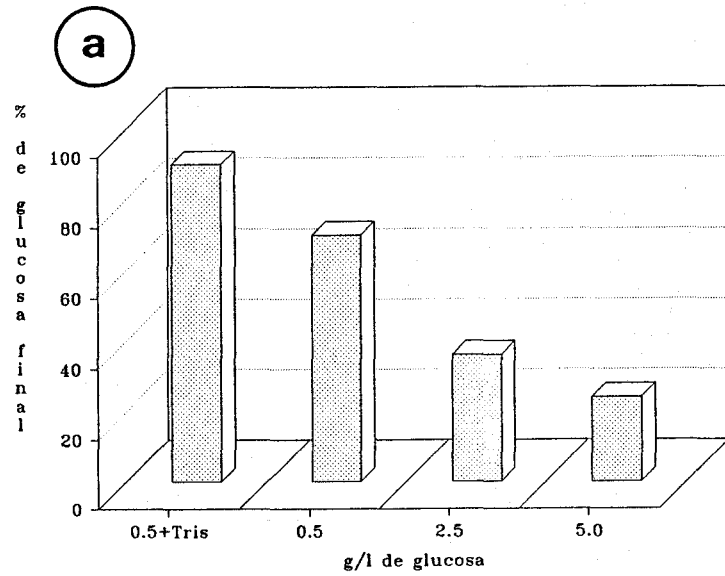
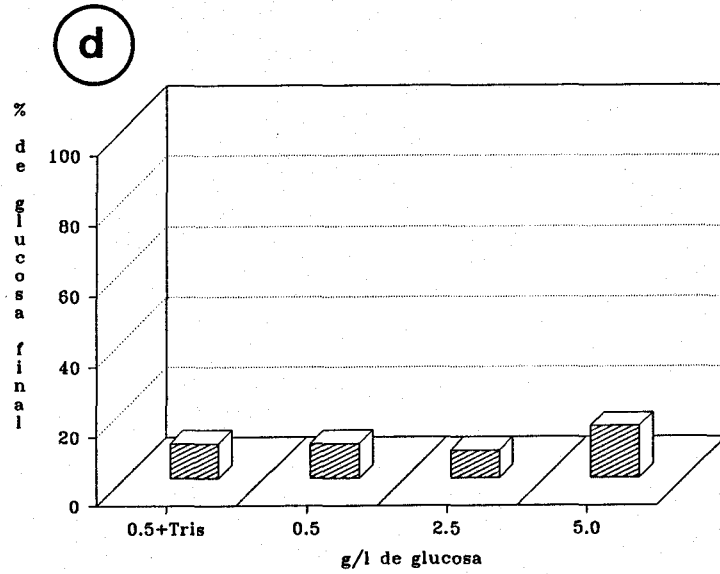
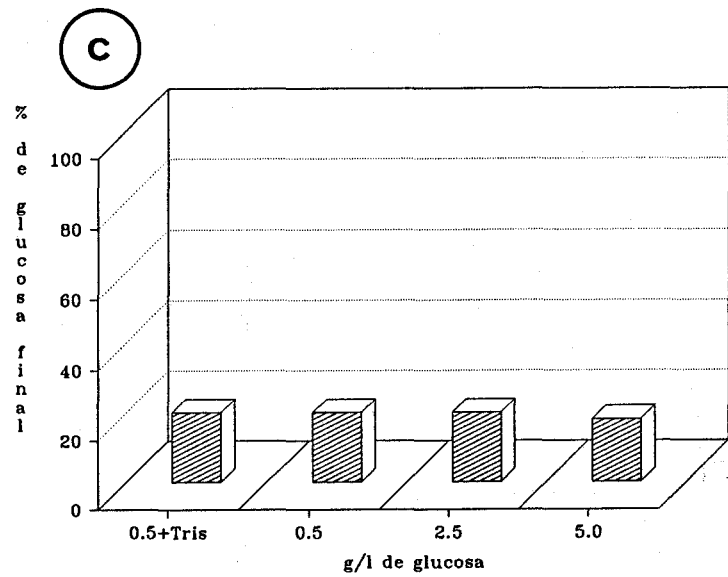
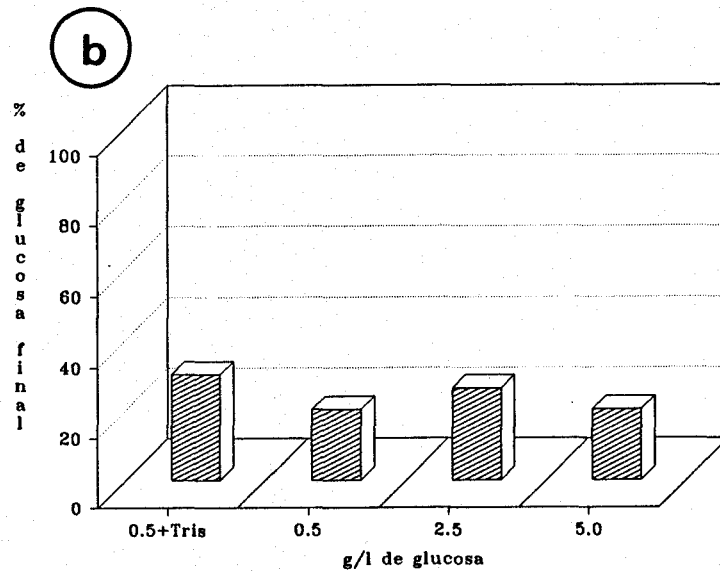
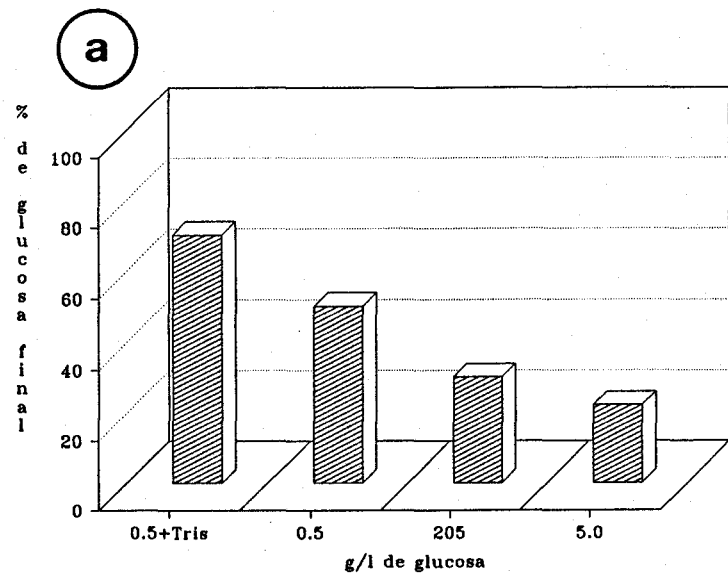


Figura 30.- Estudio del consumo de glucosa en cultivos de *Halococcus morrhuae* a distintas concentraciones iniciales de glucosa en presencia de Naranja de Acridina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.



distintas concentraciones de glucosa y extracto de levadura. Se observa que una menor concentración de extracto de levadura influye drásticamente en la eliminación de NA del medio, posiblemente debida a que a menor concentración de extracto de levadura existe una mayor permeabilidad al colorante.

La concentración creciente de glucosa no influye en el consumo de NA, lo que indica que los receptores para la permeabilidad de la NA son independientes a los que se utilizan para la permeabilidad a los carbohidratos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las cuatro especies indican que la NA penetra mejor cuando las células están en medios menos ricos de extracto de levadura, lo que haría que las células sean más permeables.

Por último, se estudia el pH final de los cultivos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*, a distintas concentraciones de glucosa y extracto de levadura en presencia de NA, observándose que en todos los casos, el pH final del medio no disminuyó drásticamente (siempre superior a 6,0), lo que sugiere que aunque se utiliza la glucosa no es mediante un metabolismo fermentativo, y que ninguna de las variables probadas influyen en el pH final.



Figura 31.- Estudio de la concentración final de Naranja de Acridina en cultivos de *Amoebobacter morrhuae*, a distintas concentraciones de glucosa, en presencia de Naranja de Acridina (50 µg/ml) y a distintas concentraciones de extracto de levadura. a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.

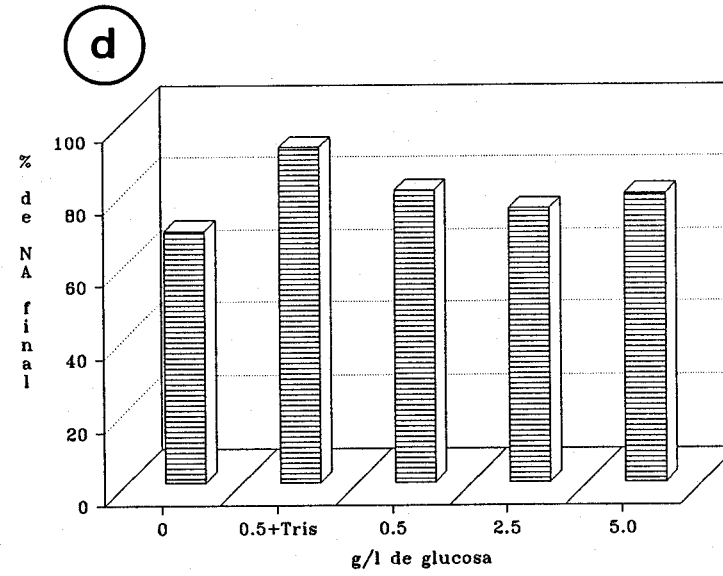
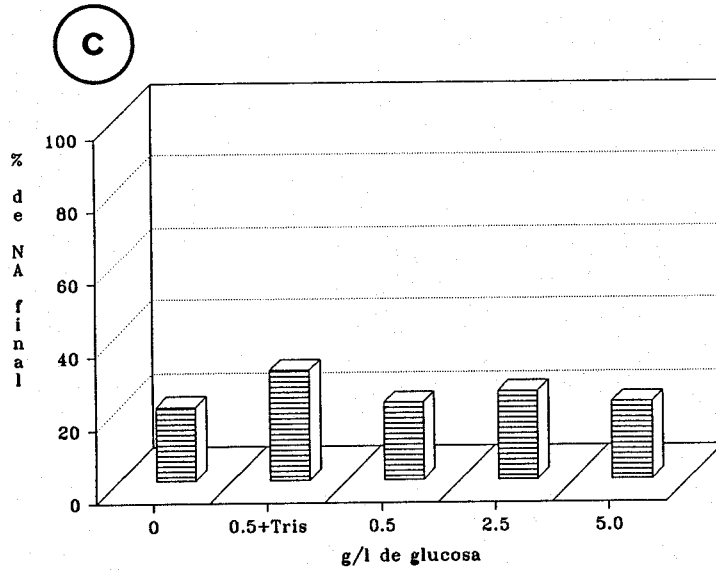
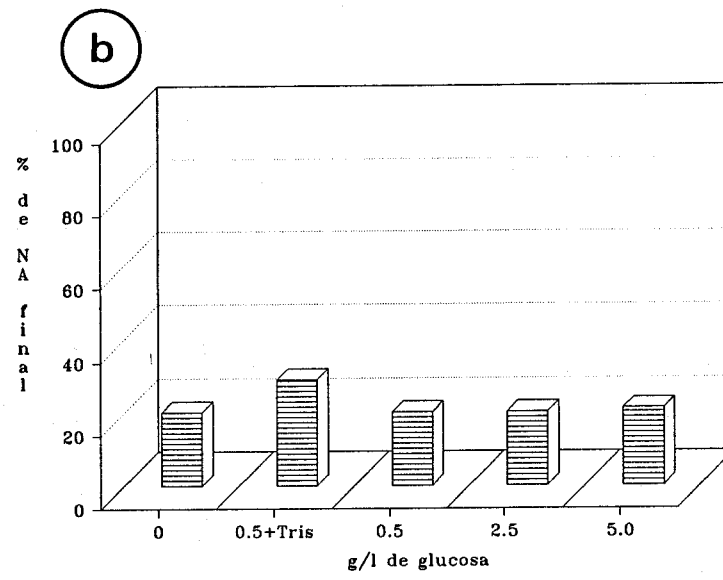
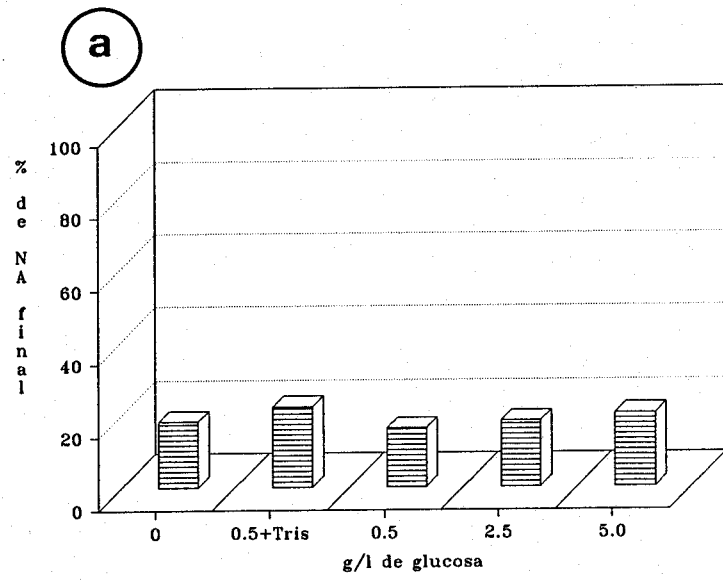


Figura 32.- Estudio de la concentración final de Naranja de Acridina en cultivos de *Haloarcula californiae*, a distintas concentraciones de glucosa, en presencia de Naranja de Acridina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.

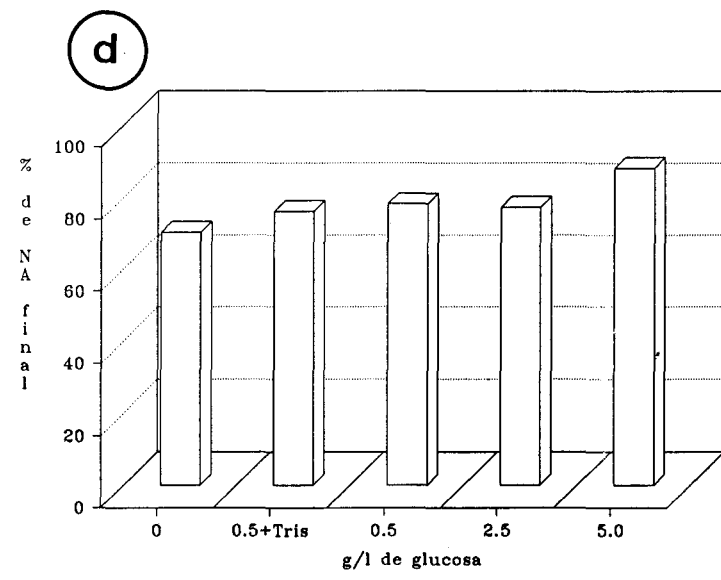
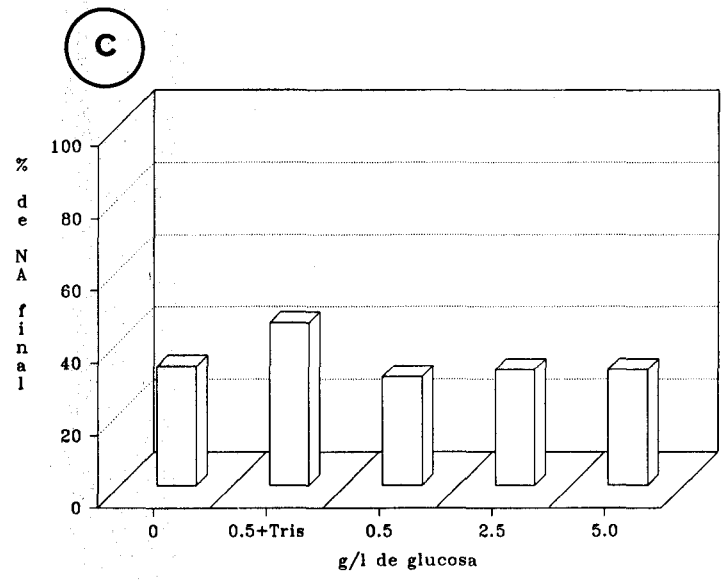
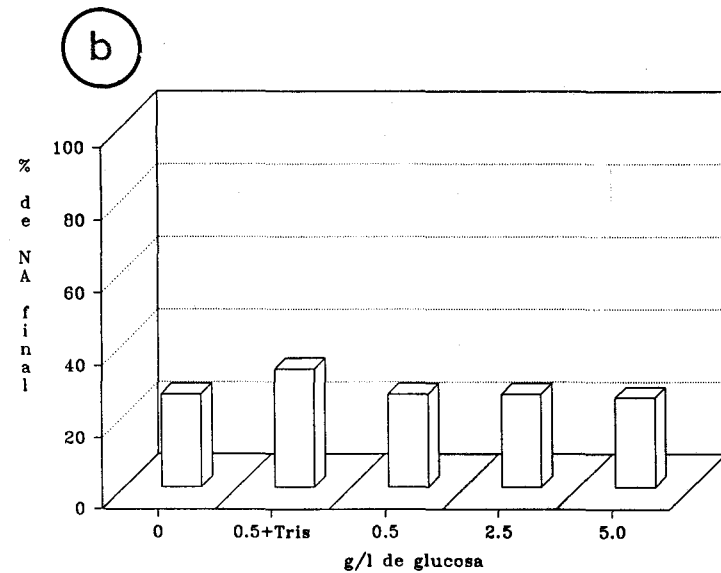
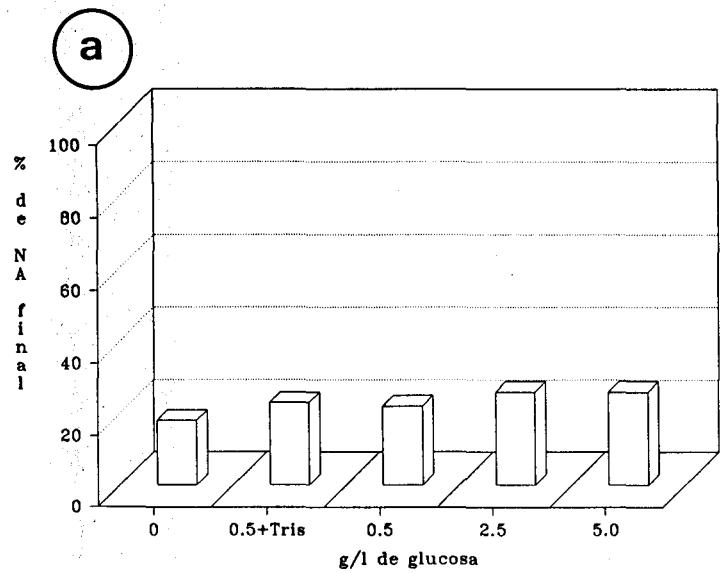


Figura 33.- Estudio de la concentración final de Naranja de Acridina en cultivos de *Halobacterium halobium*, a distintas concentraciones de glucosa, en presencia de Naranja de Acridina (50 µg/ml) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,01%; b) 0,05%; c) 0,1% y d) 0,5%.

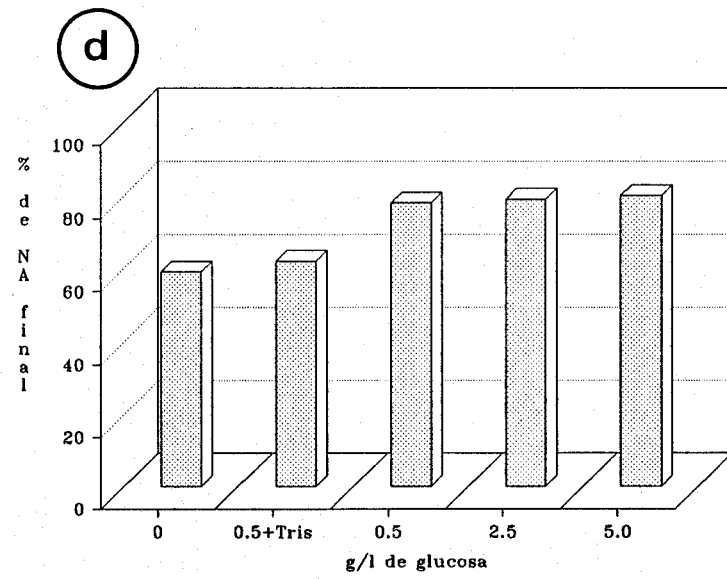
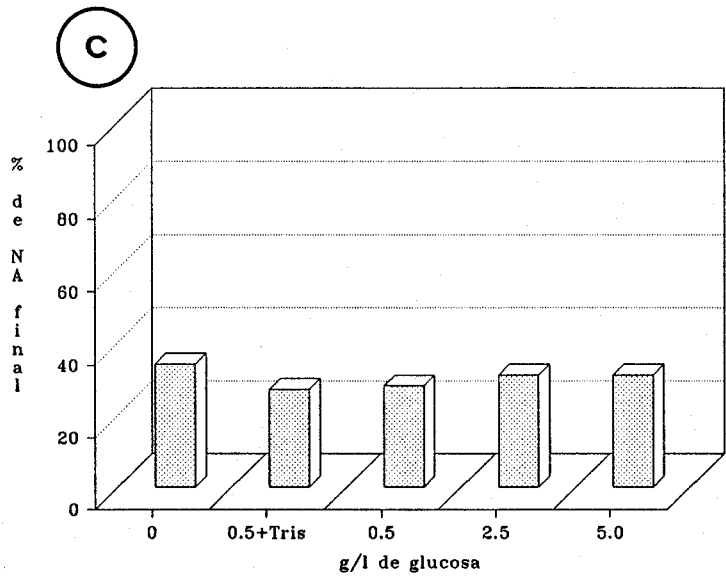
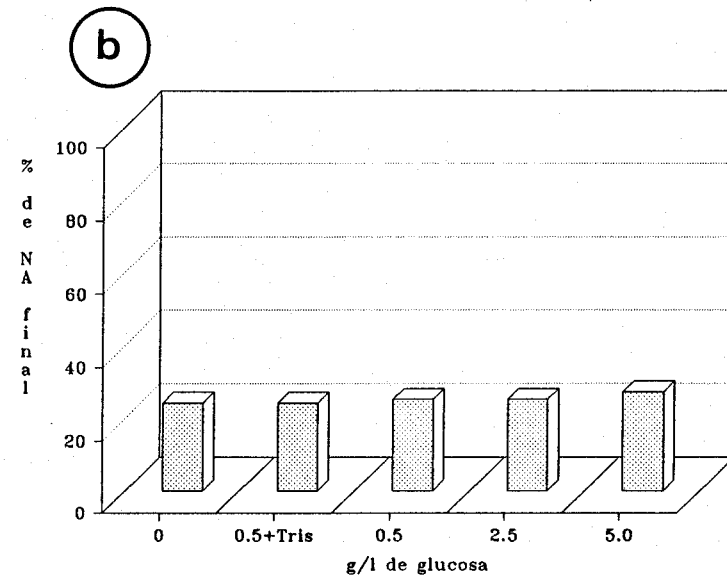
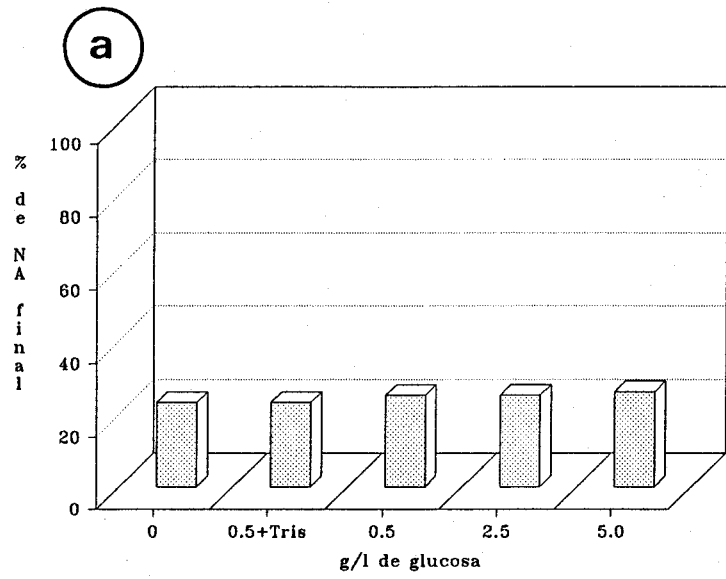
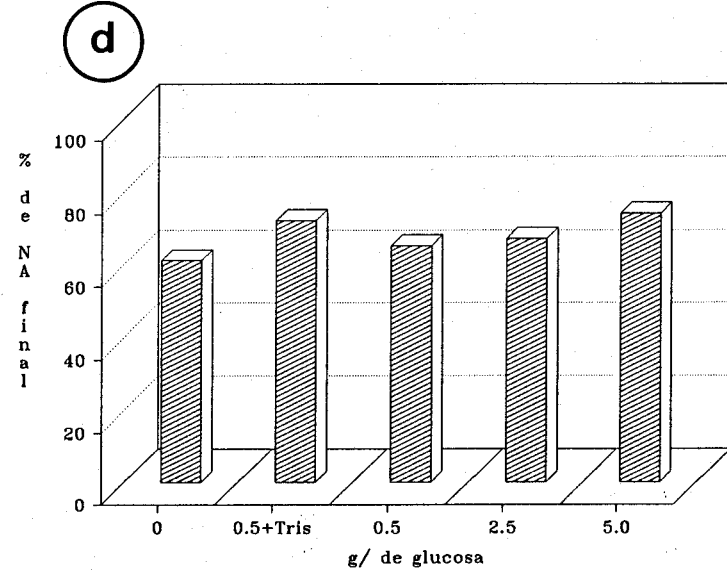
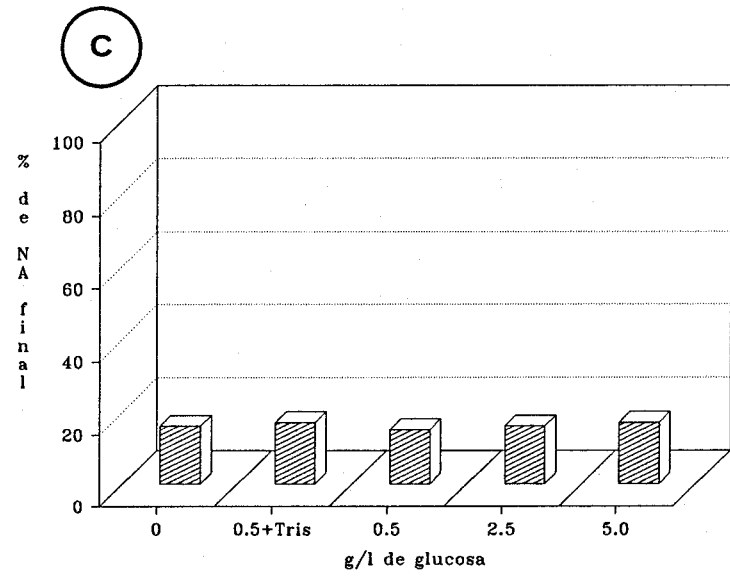
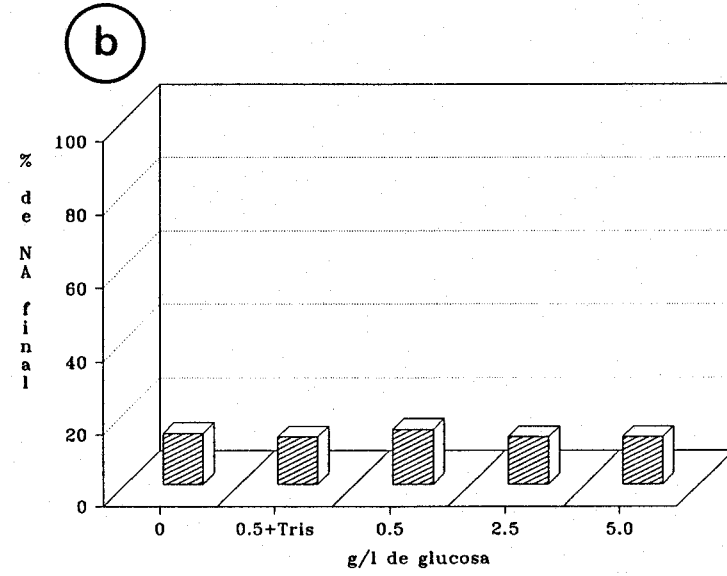
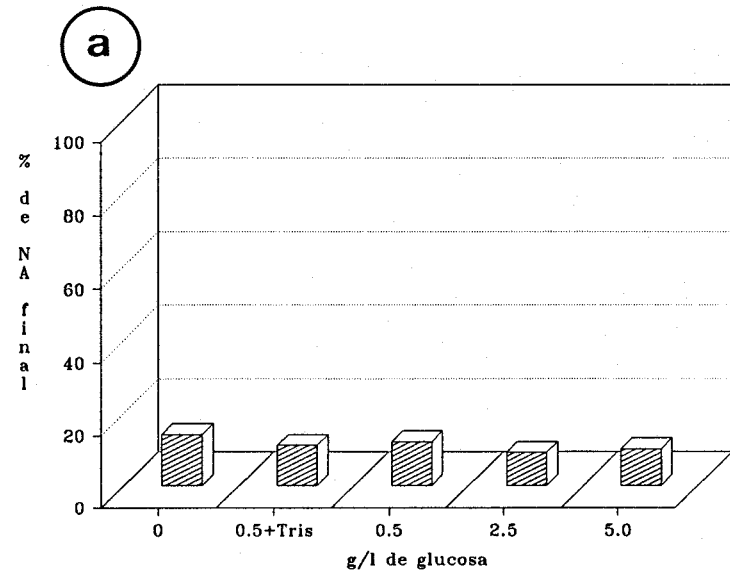


Figura 34.- Estudio de la concentración final de NA en cultivos de *Halococcus morrhuae*, a distintas concentraciones de glucosa, en presencia de NA, (100 µg/ml) y a distintas concentraciones de extracto de levadura: a) 0,001%; b) 0,005% c) 0,1% y d) 0,5% de extracto de levadura.





8. Estudio del consumo de Naranja de Acridina en cultivos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.





Para comprobar si la NA penetraba y era consumida por la célula gradualmente, influyendo en la supervivencia de los cultivos, se valoró la concentración de NA residual que quedaba en el medio a lo largo del tiempo de incubación.

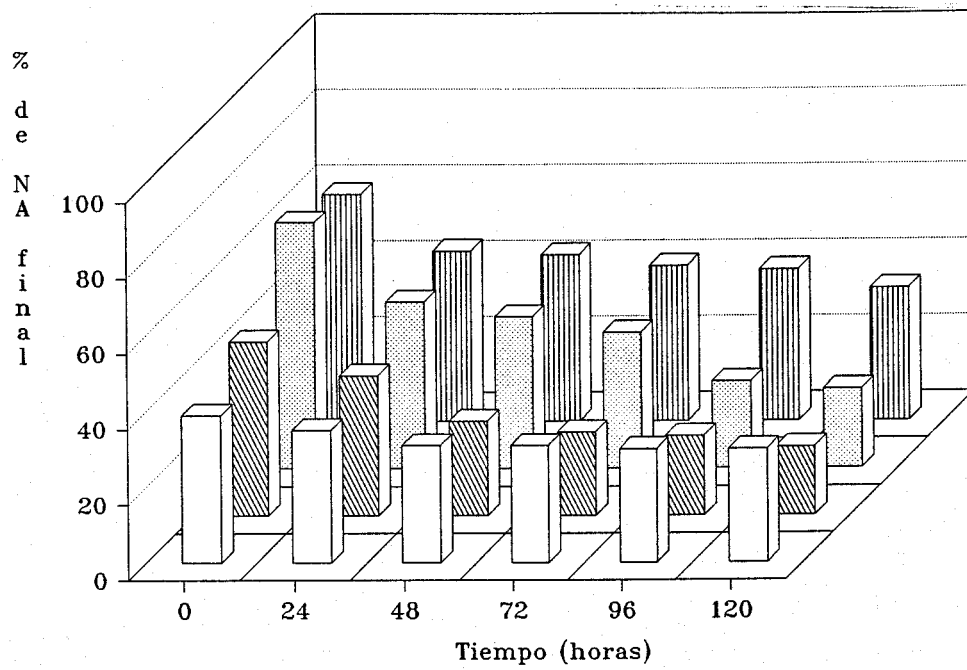
En la Figura 35 se muestran los resultados de la eliminación de NA del cultivo a través del tiempo. En ella se puede comprobar que para *A. morrhuae* y *H. californiae* disminuye ligeramente la cantidad final de NA, resultado que está de acuerdo con la disminución de la supervivencia para esta especie, indicando que la NA es utilizada posiblemente para el efecto letal del agente, quedando bloqueado en el interior de la célula, o bien que la permeabilidad de las dos especies es menor que en las otras especies, y que concentraciones bajas de NA en el interior de las células afectan drásticamente al ácido nucléico de estas especies.

Para *H. halobium*, se observa un consumo superior al que cabe esperar respecto a la supervivencia que presenta, lo que indicaría una eliminación o metabolización de la NA que influiría en el efecto final sobre el cultivo bacteriano y para *H. morrhuae* se muestra un consumo elevado de la NA y su utilización o metabolización del agente en el interior de la célula haciendo menor el efecto letal inducido por la NA.

Otra posible explicación podría ser que existiesen mecanismos de reparación muy eficaces y que fuesen más activos cuanto más tiempo esté en contacto la NA con el

Figura 35.- Estudio de la concentración final de Naranja de Acridina a lo largo del periodo de incubación de cultivos en medio líquidos de:

 *A. morrhuae*,  *H. californiae*,  *H. halobium* y  
 *H. morrhuae*.



cultivo (8,9.11 y 12).

Por otro lado, Nakamura (1967), sugiere que la NA pueda ser bloqueada por una proteína básica que interfiere competitivamente con la unión de las acridinas con los ácidos nucleicos, pudiendo de esta manera retirar NA del medio de cultivo.

## 9. Utilización de la Naranja de Acridina como agente mutagénico

Dado que la NA se utiliza clásicamente para la obtención de mutantes en virus, bacterias, células de mamíferos, etc., se buscaron una serie de parámetros que pudieran establecer el carácter mutagénico de este agente para las especies estudiadas.

Se tratarán de buscar tanto pérdidas como ganancias de funciones metabólicas.

### 9.1. Busqueda de mutantes auxotróficos

Para ello, se realizó un tratamiento con NA en las condiciones descritas en el apartado 3.11. de Materiales. Los supervivientes obtenidos en medio rico (SW-25), fueron replicados por el sistema de terciopelo a placas de medio rico y medio mínimo. Después de probar 5.250 colonias de *A. morrhuae*, 5.750 de *H. californiae*, 6.509 de *H. halobium* y 4.220 de *H. morrhuae*, no se obtuvo ningún mutante auxotrófico.

## 9.2. Movilidad bacteriana

Con este estudio se quiso comprobar si la NA podía afectar a la movilidad bacteriana. Para ello, se inoculó las placas de medio especial para la movilidad, apartado 3.3. de Materiales, con y sin NA, con 10 ul/ml de cultivo bacteriano en el centro de la placa.

Se incubaron a 37°C, durante 37 días y el halo de crecimiento, se midió a intervalos periódicos de tiempo.

A los 14 días se observó que sólo *A. morrhuae* había aumentado el diámetro del halo desde 0,5 a 0,9 cm de diámetro en la placa sin NA, no existiendo variación alguna en los otros microorganismos. En las placas con NA, no se produjo variación continuando en todas ellas el halo de 0,5 cm de diámetro.

A los 37 días de incubación se observó que el halo de *A. morrhuae* aumentó hasta 1 cm de diámetro en la placa sin NA, no existiendo ninguna modificación en las placas de los otros microorganismos ni en las que contenían NA.

## 9.3. Utilización de carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados como única fuente de carbono y energía

Para este estudio se han probado los carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados que se indican en los apartados 2.4, 2.5, 2.6 y 2.3 de Materiales, respectivamente.

En las tablas que se muestran a continuación figuran los compuestos a las que las distintas especies estudiadas presentan crecimiento y la influencia que ejerce la NA sobre su utilización.

Igualmente, se han probado el resto de los compuestos indicados, para estudiar si la NA ejercía un efecto positivo sobre su utilización. En ningún caso, una especie fue capaz de utilizar un compuesto que no fuese un sustrato normal de crecimiento.

Para ello, se siembran inóculos cultivados en presencia o ausencia de NA y se añaden mediante el replicador de Steers en placas conteniendo el compuesto correspondiente con o sin NA en el medio.

Las placas se incubaron durante 30 días a 37°C realizándose lecturas periódicas del crecimiento.

#### 9.3.1. Utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía

Los resultados obtenidos para carbohidratos después del período de incubación se muestran en las Tablas IV, V, VI y VII.

Se observa que, cuando se incuban en presencia de NA la utilización de algunos carbohidratos que habitualmente se usan, se inhibe. Así, *A. morrhuae* al inocularse sobre placas con NA en el medio, se inhibe la utilización de: galactosa, maltosa, inulina y rafinosa. En *H. californiae* se inhibe la utilización de todos los azúcares menos la lactosa. En *H.*

Tabla IV. Estudio de la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía por *A. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Carbohidratos							
Inóculo	Medio sólido	Cel	Gal	Inu	Lac	Mal	Raf	Sac	Tre
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	-	-	+	-	-	+	+
Con NA	Sin NA	+	-	-	-	-	-	-	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Azúcares: Cel (D-celobiosa), Gal (D-galactosa), Inu (Inulina), Lac (Lactosa), Mal (Maltosa), Raf (D-rafinosa), Sac (Sacarosa) y Tre (Trehalosa).

Tabla V. Estudio de la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía por *H. californiae*.

Condiciones de cultivo		Carbohidratos						
Inóculo	Medio sólido	Fru	Gal	Inu	Lac	Mal	Rib	Sac
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	-	-	+	-	-	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	-	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento

-: Indica ausencia de crecimiento.

Azúcares: Fru (D-fructosa), Gal (D-galactosa), Inu (Inulina), Lac (Lactosa), Mal (Maltosa), Rib (D-ribosa) y Sac (Sacarosa)



Tabla VI. Estudio de la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía por *H. halobium*.

Condiciones de cultivo		Carbohidratos			
Inóculo	Medio sólido	Gal	Glu	Lac	Xil
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+
	Con NA	-	+	+	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-
	Con NA	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento

-: Indica ausencia de crecimiento

Azúcares: Gal (D-galactosa), Glu (D-glucosa), Lac (Lactosa) y Xil (Xilosa).

Tabla VII. Estudio de la utilización de carbohidratos como única fuente de carbono y energía por *H. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Carbohidratos									
Inóculo	Medio sólido	Alm	Cel	Fru	Glu	Glm	Lac	Rib	Sac	Tre	Xil
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Con NA	Sin NA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	Con NA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Azúcares: Alm (Almidón), Cel (Celobiosa), Fru (D-fructosa), Glu (D-glucosa), Glm (D-glucosamina), Lac (Lactosa), Rib (D-ribosa), Sac (Sacarosa), Tre (Trehalosa) y Xil (D-xilosa).

*halobium* se inhibe la utilización de galactosa y xilosa. Y, en *H. morrhuae* se inhibe sólo la lactosa.

Cabe destacar que el patrón de azúcares inhibido en su crecimiento es particular para cada una de las especies estudiadas.

Cuando se cultivan en medio líquido con NA prácticamente queda inhibido el crecimiento para todas las especies salvo la utilización de la celobiosa por *H. morrhuae*.

#### 9.3.2. Utilización de alcoholes como única fuente de carbono y energía

Los resultados obtenidos en la utilización de alcoholes como única fuente de carbono y energía son los siguientes:

*A. morrhuae* sólo crece en las placas que contienen sorbitol tanto con NA como sin ella, procedentes del inóculo que no contiene NA.

*H. californiae* crece en las placas que contienen sorbitol sin NA y que proceden del inóculo sin NA.

*H. halobium* no creció en ninguno de los alcoholes probados y *H. morrhuae* por el contrario creció en todas las placas que contenían glicerol con NA y sin ella e incluso en las placas que procedían del inóculo con NA.

#### 9.3.3. Utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

Los resultados obtenidos para los compuestos nitrogenados se muestran en las Tablas VIII, IX, X y XI.

Tabla VIII. Estudio de la utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía por *A. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Compuestos nitrogenados								
Inóculo	Medio sólido	Gln	Leu	Lys	Phe	Gly	Orn	Pro	Put	Thr
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Compuestos nitrogenados: Gln (L-glutamina), Gly (Glicina), Leu (L-leucina), Lys (L-lisina), Phe (L-fenilalanina), Orn (L-ornitina), Pro (L-prolina), Put (Putrescina) y Thr (L-treonina).

Tabla IX. Estudio de la utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía por *H. californiae*.

Condiciones de cultivo		Compuestos nitrogenados								
Inóculo	Medio sólido	Ala	Phe	Gly	His	Leu	Lys	Orn	Pro	Tre
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Con NA	Sin NA	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Compuestos nitrogenados: Ala (L-alanina), Phe (L-fenilalanina), Gly (Glicina), His (L-histidina), Leu (L-leucina), Lys (L-lisina), Orn (L-ornitina), Pro (L-prolina) y Tre (L-treonina).

Tabla X. Estudio de la utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía por *H. halobium*.

Condiciones de cultivo		Compuestos nitrogenados									
Inóculo	Medio sólido	Ala	Alt	Asp	Cre	Phe	Met	Orn	Thr	Trp	Val
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Compuestos nitrogenados: Ala (L-alanina), Alt (Alantoína), Asp (L-aspártico), Cre (Creatina), Phe (L-fenilalanina), Met (L-metionina), Orn (L-ornitina), Thr (L-treonina), Trp (L-triptófano) y Val (L-valina).

**Tabla XI.** Estudio de la utilización de compuestos nitrogenados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía por *H. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Compuestos nitrogenados	
Inóculo	Medio sólido	Orn	Pro
Sin NA	Sin NA	+	+
	Con NA	+	+
Con NA	Sin NA	+	+
	Con NA	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Compuestos nitrogenados: Orn (L-ornitina) y Pro (L-prolina).

Se observa que *A. morrhuae* utiliza los compuestos nitrogenados indicados en la Tabla VIII cuando se cultivan en medios líquidos sin NA, pero en el medio sólido adicionado de NA se inhibe la utilización de glutamina, lisina, glicina, putrescina y treonina.

*H. californiae* muestra un patrón de utilización de compuestos nitrogenados diferente a la especie anterior en el medio sólido, y la NA, en el medio sólido, inhibe la utilización de glicina, lisina y treonina.

*H. halobium* es la especie que utiliza más compuestos nitrogenados (Tabla X) y cuando se cultiva en medio líquido sin NA pero en el medio sólido existe NA, se inhibe la utilización de la alantoína, creatina, triptófano y valina. Y, *H. morrhuae* utiliza solamente ornitina y prolina inhibiéndose su utilización solamente después de cultivar la especie en medio líquido y sólido con NA.

En todas las especies estudiadas se inhibe la utilización de compuestos nitrogenados cuando se cultivan en medio líquido en presencia de NA.

#### 9.3.4. Utilización de los ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía

Los resultados obtenidos con la utilización de ácidos orgánicos se muestran en las Tablas XII, XIII, XIV y XV.

De las cuatro especies, *A. morrhuae* es la que presenta una mayor utilización de ácidos orgánicos (Tabla XII) inhibiéndose la utilización de acetato, acetilglucosamina,



Tabla XII. Estudio de la utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía por *A. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Acidos orgánicos													
Inóculo	Medio sólido	Ace	Acg	But	Cit	Fum	Glt	Glr	Gtm	Hip	Lat	Mln	Oxa	Pir	Tar
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+	+	-	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Acidos orgánicos: Ace (Acetato), Acg (D-N-acetilglucosamina), But (Butirato), Cit (Citrato), Fum (Fumarato), Glt (DL-glicerato), Glr (D-glucuronato), Gtm (L-glutamato), Hip (Hipurato), Lat (Lactato), Mln (Malonato), Oxa (Oxalato), Pir (Piruvato) y Tar (Tartrato).

Tabla XIII. Estudio de la utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía por *H. californiae*.

Condiciones de cultivo		Acidos orgánicos					
Inóculo	Medio sólido	Ace	Acg	Cit	Lat	Mln	Pir
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	-	+	-	+	+
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	+
	Con NA	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Acidos orgánicos: Ace (Acetato), Acg (D-N-acetilglucosamina), Cit (Citrato), Lat (Lactato), Mln (Malonato) y Pir (Piruvato)

Tabla XIV. Estudio de la utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía por *H. halobium*.

Condiciones de cultivo		Acidos orgánicos						
Inóculo	Medio sólido	Ben	Gtm	Lat	Mat	Mln	Pir	Suc
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	+	+	+	+	+	-
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	+	-
	Con NA	-	-	-	-	-	+	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Acidos orgánicos: Ben (Benzoato), Gtm (L-glutamato), Mat (Malato), Mln (Malonato), Pir (Piruvato) y Suc (Succinato).

Tabla XV. Estudio de la utilización de ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía por *H. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Acidos orgánicos								
Inóculo	Medio sólido	But	Cit	Fum	Glt	Glr	Hip	Mat	Mln	Pir
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
Con NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+
	Con NA	-	-	+	-	-	-	-	-	+

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve.

-: Indica ausencia de crecimiento

Acidos orgánicos: But (Butirato), Cit (Citrato), Fum (Fumarato), Glt (DL-glicerato), Glr (D-glucuronato), Hip (Hipurato), Mat (Malato), Mln (Malonato) y Pir (Piruvato).

glicerato, glucuronato, glutamato, lactato, piruvato y tartrato cuando se incuban en medios sólidos con NA.

*H. californiae* presenta inhibición de acetato, acetilglucosamina y lactato. *H. halobium* no crece en presencia de NA cuando se utiliza benzoato y succinato y *H. morrhuae* sólo se ve afectada cuando se utiliza el inóculo previamente crecido en presencia de NA y los medios sólidos presentan NA, salvo para fumarato y piruvato que no está inhibido el crecimiento.

#### 9.4. Influencia de la Naranja de Acridina en la resistencia a antibióticos y metales pesados de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. halobium*

Para comprobar si la NA producía en los microorganismos en estudio algún efecto sobre la resistencia a antibióticos y metales pesados, se tomaron inóculos en fase logarítmica de crecimiento con NA y sin ella y se sembraron respectivamente con el replicador de Steers en placas con y sin NA, conteniendo las distintas concentraciones de antibióticos y metales pesados.

Se incubaron las placas a 37°C en oscuridad durante 30 días. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas XVI, XVII, XVIII y XIX para resistencia a antibióticos y XX, XXI, XXII y XXIII para resistencia a metales pesados.

Se observa que *A. morrhuae* pierde la resistencia a bacitracina (50) y eritromicina (100), no así para la ampicilina y neomicina que se perdió la resistencia después

Tabla XVI. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a antibióticos de *A. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Antibióticos (ug/ml)			
		Amp	Bac	Ery	Neo
Inóculo	medio sólido	100	50	100	100
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+
	Con NA	+	-	-	+
Con NA	Sin NA	+	-	-	+
	Con NA	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Antibióticos: Amp (Ampicilina), Bac (Bacitracina), Ery (Eritromicina) y Neo (Neomicina).

Tabla XVII. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a los antibióticos de *H. californiae*.

Condiciones de cultivo		Antibióticos (ug/ml)									
		Apm	Bac	Neo		Nov			Rif		
Inóculo	Medio sólido	100	50	100	50	100	50	10	100	10	5
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Con NA	Sin NA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+. Indica presencia de crecimiento.

-. Indica ausencia de crecimiento.

Antibióticos: Amp (Ampicilina), Bac (Bacitracina), Neo (Neomicina), Nov (Novobiocina) y Rif (Rifampicina).

Tabla XVIII. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a antibióticos de *H. halobium*.

Condiciones de cultivo		Antibióticos (ug/ml)				
		Amp	Bac	Ery	Neo	Nov
Inóculo	Medio de cultivo	100	50	100	100	10
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+/-
	Con NA	+	+	+	+	+/-
Con NA	Sin NA	+	-	-	+	-
	Con NA	+	-	-	+	-

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Antibióticos: Amp (Ampicilina), Bac (Bacitracina), Ery (Eritromicina), Neo (Neomicina) y Nov (Novobiocina).



Tabla XIX. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a antibióticos *H. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Antibióticos (ug/ml)		
		Amp	Neo	Rif
Inóculo	Medio de cultivo	100	10	5
Sin NA	Sin NA	+	+	+
	Con NA	-	+	-
Con NA	Sin NA	-	-	-
	Con NA	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Antibióticos: Amp (Ampicilina), Neo (Neomicina) y Rif (Rifampicina).

**Tabla XX.** Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a metales pesados de *A. morrhuae*

Condiciones de cultivo		Metales pesados (mM)													
		Pb		Cu	Cr	As	Ag		Ni	Co	Cd		Hg		Zn
Inóculo	Medio sólido	5	2,5	1,25	0,1	5	0,25	0,1	1,25	0,1	1,5	0,5	0,005	0,0025	0,5
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-	-	+	-
Con NA	Sin NA	-	-	+	-	+	+/-	+	+	+	-	-	-	+	-
	Con NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Metales pesados: Pb (Plomo), Cu (Cobre), Cr (Cromo), As (Arsénico), Ag (Plata), Ni (Níquel), Co (Cobalto), Cd (Cadmio), Hg (Mercurio) y Zn (Zinc).

Tabla XXI. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a metales pesados de *H. californiae*.

Condiciones de cultivo		Metales pesados (mM)									
		Pb	Cu		Cr	As	Ag	Ni	Co	Cd	Hg
Inóculo	Medio sólido	5	1,25	0,75	0,1	10	0,1	1,25	0,1	0,5	0,0025
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Con NA	Sin NA	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Con NA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Metales pesados: Pb (Plomo), Cu (Cobre), Cr (Cromo), As (Arsénico), Ag (Plata), Ni (Níquel), Co (Cobalto)

Cd (Cadmio) y Hg (Mercurio).

Tabla XXII. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a metales pesados de *H. halobium*.

Condiciones de cultivo		Metales pesados (mM)																
		Pb	Cu	Cr	As		Ag		Ni		Co			Cd			Hg	Zn
Inóculo	Medio sólido	10	2,5	0,1	10	5	0,1	0,01	2,5	1,25	1,25	0,75	0,1	1,5	1	0,5	0,0025	0,5
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	-
Con NA	Sin NA	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+/-	+	+	-
	Con NA	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+/-	+	-

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve

-: Indica ausencia de crecimiento.

Metales pesados: Pb (Plomo), Cu (Cobre), Cr (Cromo), As (Arsénico), Ag (Plata), Ni (Níquel), Co (Cobalto), Cd (Cadmio), Hg (Mercurio) y Zn (Zinc).

Tabla XXIII. Estudio de la influencia de la Naranja de Acridina sobre la resistencia a metales pesados de *H. morrhuae*.

Condiciones de cultivo		Metales pesados (mM)												
		Pb	Cu		Cr			As	Ag	Ni		Co	Cd	Hg
Inóculo	Medio sólido	2,5	2,5	1,25	1,5	1	0,1	5	0,01	2,5	1,25	0,1	0,5	0,0025
Sin NA	Sin NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Con NA	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Con NA	Sin NA	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+/-	-	+
	Con NA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+: Indica presencia de crecimiento.

+/-: Indica crecimiento leve.

-: Indica ausencia de crecimiento.

Metales pesados: Pb (plomo), Cu (cobre), Cr (Cromo), As (Arsénico), Ag (Plata), Ni (Níquel), Co (Cobalto), Cd (Cadmio) y Hg (Mercurio).

de cultivar en medio líquido en presencia de NA.

*H. californiae* pierde pronto la resistencia a ampicilina (100), bacitracina(50), neomicina (100), novobiocina (100) y rifampicina (100), cuando se inoculan los cultivos sin NA y se siembran en placas con NA.

Curiosamente, cuando disminuye la resistencia a los antibióticos (neomicina, novobiocina y rifampicina) los cultivos necesitan un mayor contacto con la NA para perder la resistencia.

*H. halobium* muestra un comportamiento muy diferente a las cepas anteriores, y la resistencia a la ampicilina y a la neomicina no se pierde por la presencia de NA, sin embargo es muy sensible a la novobiocina. *H. morrhuae* sólo resiste a tres antibióticos y pronto pierde esta resistencia.

Para el estudio a la resistencia a los metales pesados, se ha tomado como referencia las MICs que presentan estas especies frente a los metales pesados y estudiado la pérdida de la misma.

En la Tabla XX se muestran los resultados que presenta *A. morrhuae*, observándose que se pierde la resistencia de Pb, Cd, Hg (0,005) y Zn (0,5) cuando se cultivan en medios sólidos con NA.

Para el caso de *H. californiae*, la resistencia al cobre (0,75) no se pierde en presencia de NA y para el resto de los metales es necesario que el inóculo haya sido crecido en presencia de NA.

*H. halobium* muestra que la resistencia a Pb, Cu, Cr, As

(5), Ag (0,01), Ni (1,25), Co (0,1) y Hg (0,0025) no se pierde después del tratamiento con NA, siendo ésta la especie más resistente al efecto de la presencia de NA. Por último, en *H. morrhuae*, salvo para el Cu y Ni (1,25), la resistencia a los demás metales se pierde en presencia de NA.

Muchas de las resistencias a antibióticos y metales pesados van codificadas en plásmidos, siendo en muchos de estos casos motivada la pérdida de resistencia a los mismos, por la pérdida de plásmidos. Este término no se ha podido establecer experimentalmente y no se ha encontrado una correlación con los estudios realizados.

Como resumen de este apartado de la NA como agente mutagénico, cabe destacar que no se han establecido nuevas funciones metabólicas o de resistencia debido a la presencia de NA. Ahora bien, para casi todos los casos y especies estudiadas, existe una inhibición de las funciones metabólicas por el agente mutagénico y este efecto no es revertido.

#### 10. Influencia de la Naranja de Acridina en la formación de velo superficial de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Como en los estudios preliminares realizados por Fernández del Castillo (1987), la especie *H. halobium* no tiene la capacidad de formar PHB cuando se cultiva en un medio determinado. Se quiso estudiar con estos experimentos, la influencia de la NA en la producción de PHB por estas especies.

Se realizaron los cultivos en presencia y ausencia de NA en las cuatro especies, observando que tras 30 días de incubación no apareció velo superficial en ningún caso.

11. Estudio de la producción y análisis de polisacáridos de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*, en presencia de Naranja de Acridina.

En el presente estudio, se realiza la producción de los polisacáridos en un medio no definido (apartado 3.7 de Materiales), de las cepas indicadas en ausencia y presencia de la NA, así como el análisis de la composición de las mismas.

Los experimentos se realizaron en el medio indicado en agitación y 37°C. De la extracción de los mismos, se deduce la presencia de dos fracciones extraíbles que morfológicamente presentan un aspecto diferente, siendo la primera extracción realizada inmediatamente después de la adición de la acetona y la segunda extracción tras un reposo de 24 horas en cámara a 4°C. La primera extracción al precipitar presentó un aspecto laxo pero gelatinoso, mientras que la segunda extracción es de aspecto pulverulento y fué recogido por centrifugación.

En la tabla XXIV, se muestra el estudio comparativo de la producción de polisacárido en presencia y ausencia de NA, de las cuatro especies y tras un período de incubación de 7 y 14 días. De forma general podemos indicar que:

1) el número de células disminuye a lo largo del tiempo y en



Tabla XXIV. Estudio de la producción de polisacárido por *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae* en presencia de Naranja de Acridina.

Especies	Polisacáridos							
	Primera extracción				Segunda extracción			
	7 días	7 días + NA	14 días	14 días + NA	7 días	7 días + NA	14 días	14 días + NA
<i>A. morrhuae</i>	$2,8 \times 10^7$ *	$3,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^2$
	12,6 **	n.d.	38,0	n.d.	17,5	80,0	123,0	67,0
<i>H. californiae</i>	$6,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^4$	$6,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^4$
	1,2	2,3	26,0	14,0	9,8	30,0	50,0	80,0
<i>H. halobium</i>	$6,5 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$6,5 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$
	35,5	18,3	33,2	33,2	84,0	62,0	38,0	120,0
<i>H. morrhuae</i>	$2,8 \times 10^8$	$7,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^8$	$7,3 \times 10^2$	$8,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^3$
	20,0	3,9	32,5	18,0	44,8	55,5	119,0	60,0

\*): Indica número de células por ml de cultivo.

\*\*): Indica la concentración en g/l.

presencia de NA, 2) la producción tanto en la primera como en la segunda extracción aumenta con el período de incubación salvo para *H. halobium* que presenta una ligera disminución en la producción de la primera extracción sin NA y un descenso marcado en la producción de la segunda extracción sin NA.

La NA no parece influir en la síntesis de la primera extracción ya que en *A. morrhuae* y *H. californiae* se aumenta la cantidad producida, no así en *H. halobium* y *H. morrhuae*.

En la segunda extracción, para *A. morrhuae* se muestra una inhibición de la síntesis a los 14 días, aunque se debe de tener en cuenta que el número de células disminuye. En las otras tres especies, la NA no influye en la síntesis de polisacáridos de la segunda extracción.

3) El óptimo de producción del polisacárido de primera y segunda extracción es a los 14 días salvo por *H. halobium* que los datos encontrados indican una mayor producción a los 7 días.

Los datos de producción obtenidos con estas especies son en todos los casos superiores a los obtenidos por J. Antón (1989) para *Haloferax mediterranei* (máximo de 2,9 g/l), en condiciones similares de cultivos.

Cabe considerar también que como indica Tait y col. (1986) las fracciones extraídas llevan como contaminantes normales proteínas que en algunos casos pueden llegar a ser hasta del 63% del peso seco total (Ghai y col. 1981),

Los experimentos realizados, no se han orientado al estudio del contenido protéico de la extracciones indicadas,

luego podríamos suponer que en las fracciones extraídas existan determinadas sustancias contaminantes y que el contenido de la misma está en función, quizás, del tipo de método de extracción con acetona (J. Antón, 1989).

El estudio tentativo de la composición en azúcares de los carbohidratos se ha realizado por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, los polisacáridos fueron dializados y liofilizados. Una cantidad conocida fue resuspendida y utilizada para una hidrólisis total ácida y tras filtración fue analizado por la técnica indicada.

En la Figura 36a, se muestran algunos de los cromatogramas de *A. morrhuae* de la primera y segunda extracción en presencia y ausencia de NA.

En la Tabla XXV, se muestran los tiempos de retención de los picos aparecidos. Para la primera y segunda extracción se observa que fundamentalmente no varían los picos aparecidos.

La presencia de NA no induce una variación en la composición del polisacárido y ambas extracciones parecen ser el mismo tipo de sustancia.

Del análisis cromatográfico y la comparación con los patrones de azúcares, el polisacárido de *A. morrhuae* parece presentar ácidos urónicos (aproximadamente 13,50), presumiblemente diferentes a glucurónicos y galacturónicos, glucosa (aproximadamente 18,00) y galactosa (aproximadamente 19,00) que podría estar enmascarando a la manosa

Tabla XXV. Tiempos de retención de las fracciones polisacarídicas analizadas por C.L.A.R. de *Amoebobacter morrhuae*.

Condiciones de cultivo y tipo de extracción	Tiempos de retención (min)					
<b>1a Extracción</b>						
7 días	12,53	13,50	17,05	18,15	25,49	26,60
14 días	12,69	-	17,34	18,32	25,65	28,45
<b>2a Extracción</b>						
7 días	12,83	13,79	17,22	18,24	26,19	27,18
7 días + NA	12,90	13,62	17,25	18,30	26,28	27,41
14 días	12,53	13,05	17,12	18,10	25,48	26,51
14 días + NA	12,54	13,70	17,05	18,07	25,49	26,57

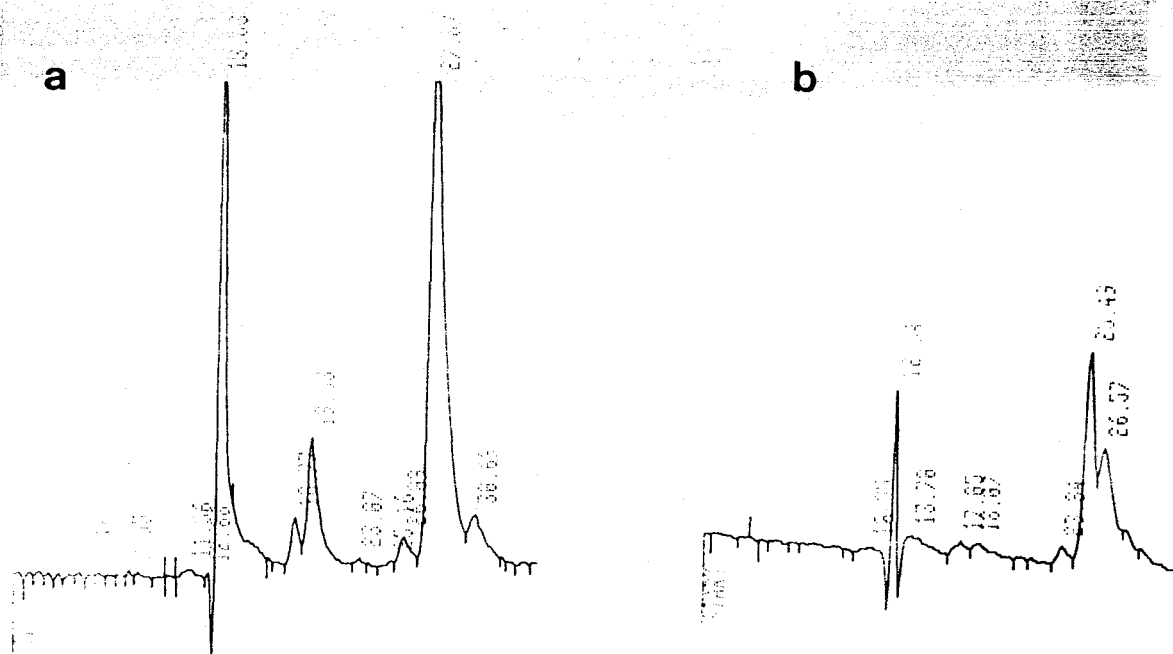


Figura 36a. Cromatograma correspondiente por análisis de C.L.A.R. de las fracciones polisacarídicas de *A.morrhuae* a) primera extracción en ausencia de Naranja de Acridina. b) segunda extracción en presencia de Naranja de acridina.

(aproximadamente 19,10). el pico que se presenta a (aproximadamente 26,50), podría ser indicativo de la presencia de acetatos.

En la Figura 36b, se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos con polisacáridos de *H. californiae* y en la Tabla XXVI se indican los tiempos de retención obtenidos.

De los datos indicados se deduce que la estructura del polisacárido de la primera y segunda extracción es muy similar y que no sufre alteraciones mencionables en presencia de la NA. Este polisacárido difiere del de *A. morrhuae* en la ausencia del pico correspondiente a los acetatos y la aparición de un marcado pico con tiempo de retención de (aproximadamente 27,50). El contenido en glucosa y galactosa y/o manosa parece similar.

Los resultados obtenidos para *H. halobium* se muestran en la Figura 37a y Tabla XXVII.

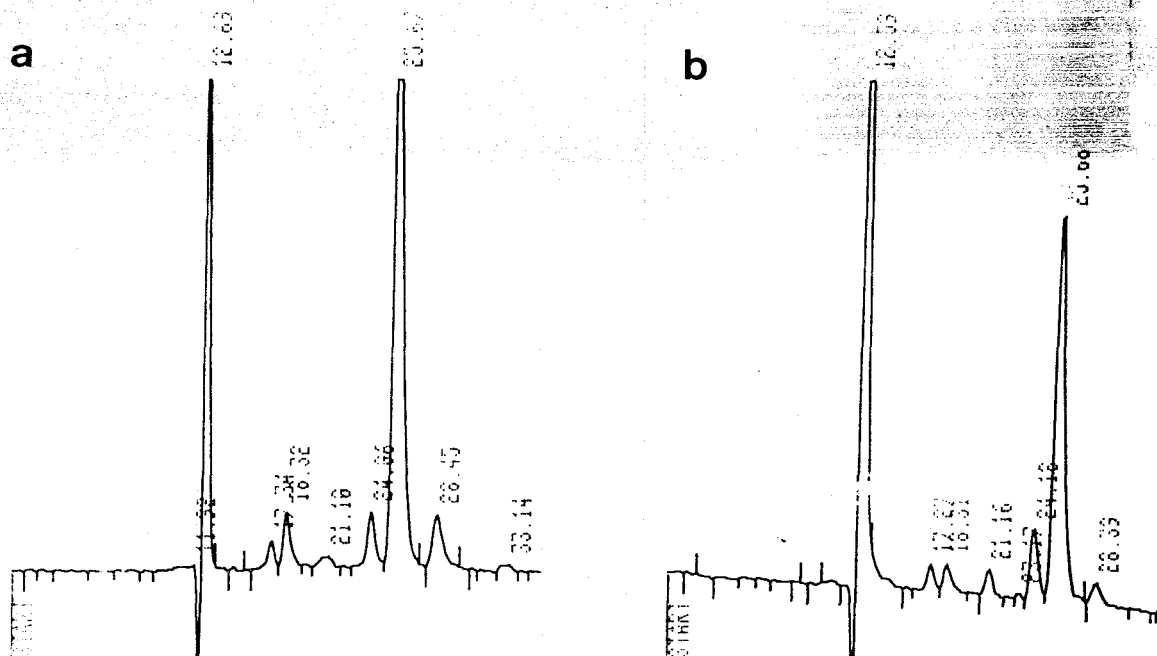


Figura 36b. Cromatograma correspondiente por análisis de C.L.A.R. de las fracciones polisacarídicas de *H. californiae* a) primera extracción en ausencia de Naranja de Acridina. b) segunda extracción en presencia de Naranja de Acridina.

Tabla XXVI. Tiempos de retención de las fracciones polisacarídicas analizadas por C.L.A.R. de *Haloarcula californiae*.

Condiciones de cultivo y tipo de extracción	Tiempos de retención (min)				
1ª Extracción					
7 días	13,63	18,77	19,83	26,09	27,87
7 días + NA	13,96	19,10	20,32	26,71	28,52
14 días	-	-	-	26,15	28,67
14 días + NA	12,60	17,32	18,35	24,16	26,09
2ª Extracción					
7 días + NA	13,28	18,23	19,40	25,55	27,16
14 días	-	-	-	26,48	28,75
14 días + NA	12,59	17,27	18,31	24,18	25,68



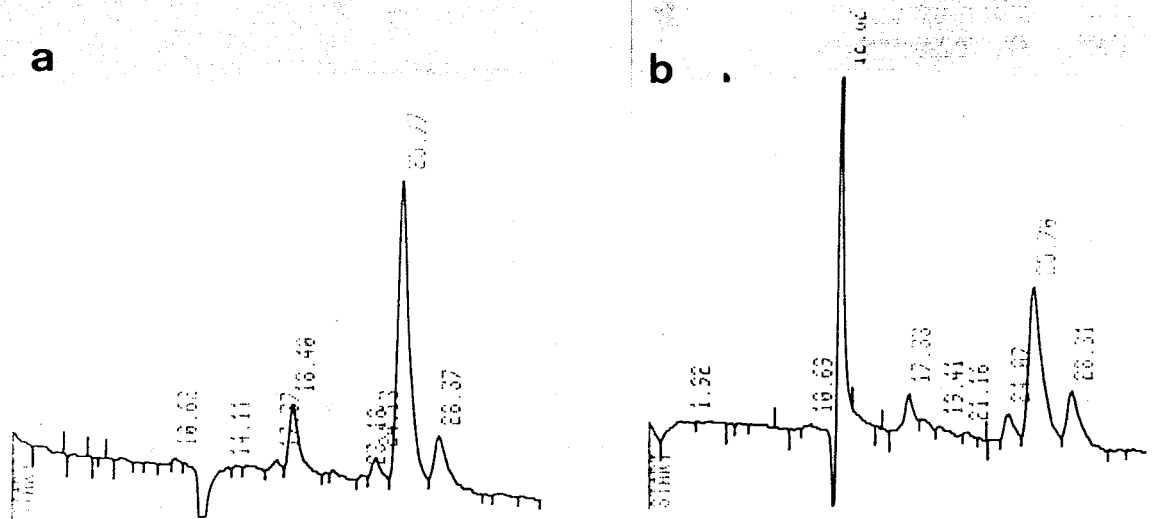


Figura 37a. Cromatograma correspondiente por análisis de C.L.A.R. se las fracciones polisacarídicas de *H. halobium* de a) primera extracción en ausencia de Naranja de Acridina. b) segunda extracción en presencia de Naranja de acridina.

Tabla XXVII. Tiempos de retención de las fracciones polisacarídicas analizadas por C.L.A.R. de *Halobacterium halobium*.

Condiciones de cultivo y tipo de retención	Tiempos de retención (min)			
1ª Extracción				
7 días	-	17,37	18,40	25,77
7 días + NA	-	17,27	18,30	25,66
14 días	-	17,24	18,51	-
14 días + NA	-	17,24	18,37	-
2ª Extracción				
7 días	12,62	17,33	-	25,70
7 días + NA	12,62	17,28	-	25,67
14 días	-	17,21	18,50	-

De ellos se deduce que existen diferencias significativas entre el polisacárido de la primera y segunda extracción y en los polisacáridos obtenidos a los 14 días, aunque no se observan diferencias cuando se tratan con NA.

El polisacárido de la primera extracción parece no presentar ácidos urónicos y sí glucosa y galactosa y el de la segunda extracción posee ácidos urónicos y carece de galactosa. Ninguno de ellos tener acetatos.

Por último, *H. morrhuae* muestra sus resultados en la Figura 37b y Tabla XXVIII.

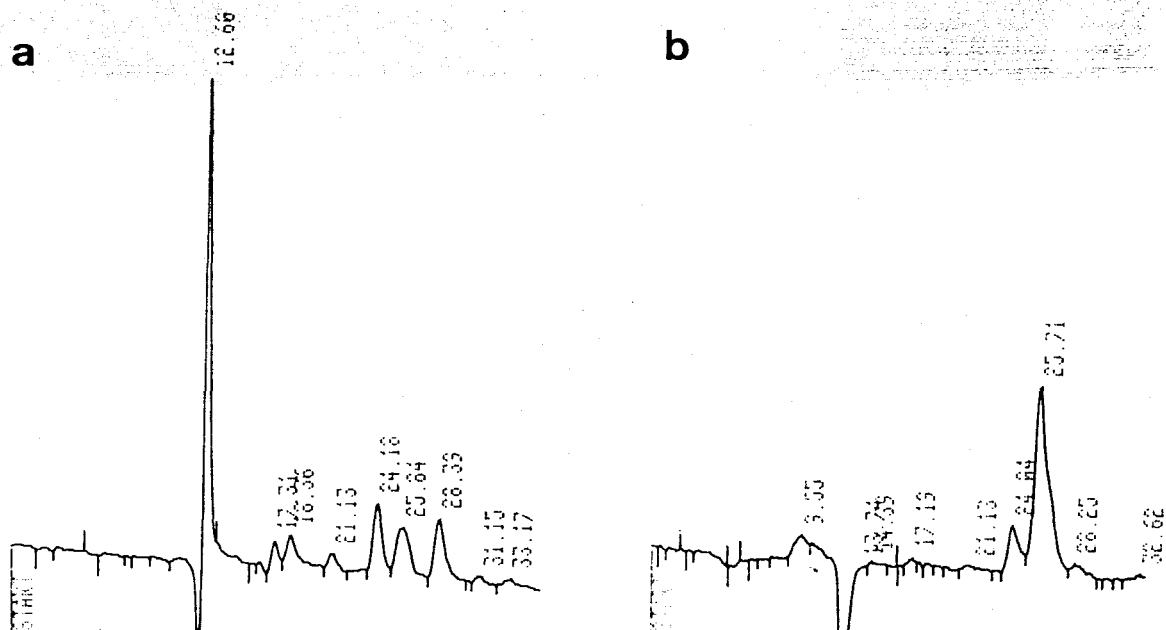


Figura 37b. Cromatograma correspondiente por análisis de C.L.A.R. de las fracciones polisacarídicas de *H. morrhuae* a) primera extracción en ausencia de Naranja de Acridina. b) segunda extracción en presencia de Naranja de Acridina.

Tabla XXVIII. Tiempos de retención de las fracciones polisacarídicas analizadas por C.L.A.R. de *Halococcus morrhuae*.

Condiciones de cultivo y tipo de retención	Tiempos de retención (min)				
1ª Extracción					
7 días	12,78	17,54	18,88	-	26,01
7 días + NA	12,63	16,91	18,59		25,71
14 días	12,60	17,31	18,36	21,13	25,84
14 días + NA	12,61	17,29	18,29	21,20	25,68
2ª Extracción					
7 días	12,79	-	-	-	26,08
7 días + NA	-	17,19	-	-	25,75
14 días	12,61	16,95	-	21,29	26,07
14 días + NA	-	16,92	-	21,02	25,68

De ellas se deduce que existe variación en el polisacárido de la primera y segunda extracción, mostrándose que falta el pico correspondiente a la galactosa en los polisacáridos de la segunda extracción y que en presencia de la NA, se pierde el pico presumiblemente correspondiente a los ácidos urónicos, siendo este comportamiento más similar al que presenta *H. halobium*. Igualmente aparece un nuevo pico (aproximadamente 21,10) en la primera y segunda extracción tras 14 días de incubación.

Evidentemente, estos estudios son preliminares en cuanto a la composición de los polisacáridos producidos por estas cuatro especies, pero se creyó interesante estudiar sobre todo, la posible influencia de la NA en las mismas. No obstante, los resultados obtenidos no son muy diferentes a los obtenidos por J. Antón (1989), con las especies de *H. mediterranei* en la composición de sus exopolisacáridos, que preliminarmente son polisacáridos acídicos, con ácidos urónicos y con azúcares neutros como glucosa, galactosa y manosa.

## 12. Estudio microscópico de la influencia de la Naranja de Acridina en la morfología celular y movilidad de *A. morrhuae*, *H. californiae*, *H. halobium* y *H. morrhuae*.

Se quiso comprobar si la presencia de NA afectaba la morfología y la movilidad de las células de los microorganismos en estudio. Para ello se pusieron en contacto con NA a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 ug/ml.

De estos cultivos se toman muestras a las 3, 6, 12, 24 y

48 horas de incubación observándolas al microscopio de contraste de fase.

De forma general, la movilidad se ve incrementada a todas las concentraciones de NA empleadas y en todos los tiempos utilizados. El número de células disminuye con el aumento de la concentración de la NA y con el tiempo de incubación. La morfología celular varía a las distintas concentraciones de NA aunque ésta se mantiene a lo largo del tiempo.

Así en *A. morrhuae*, (Figura 38), la mayoría de los bacilos disminuyen de tamaño, acorándose y engrosándose a la vez, y en los que se mantienen largos se observa un engrosamiento en los extremos parecidos a palillos de tambor. La movilidad en esta bacteria es extremada.

En *H. californiae* (Figura 39), se observa que no hay pérdida de su refringencia vacuolar cuando está expuesta a la NA, sí hay disminución del número de células y del tamaño. La movilidad no es tan acusada como en el caso anterior.

Los bacilos de *H. halobium* (Figura 40), también acortan su tamaño, observándose como contraste la aparición de algunos bacilos muy largos y refringentes. La movilidad es menor que en *A. morrhuae*.

Las células de *H. morrhuae*, (Figura 41), cuando se encuentran en presencia de NA se agrupan a modo de racimos de uvas, engrosan su tamaño y adquieren gran movilidad parecida a un temblor de azogue.

Figura 38. Microfotografía de *A. morrhuae*. En ella podemos observar la morfología de los bacilos en presencia y ausencia de Naranja de Acridina



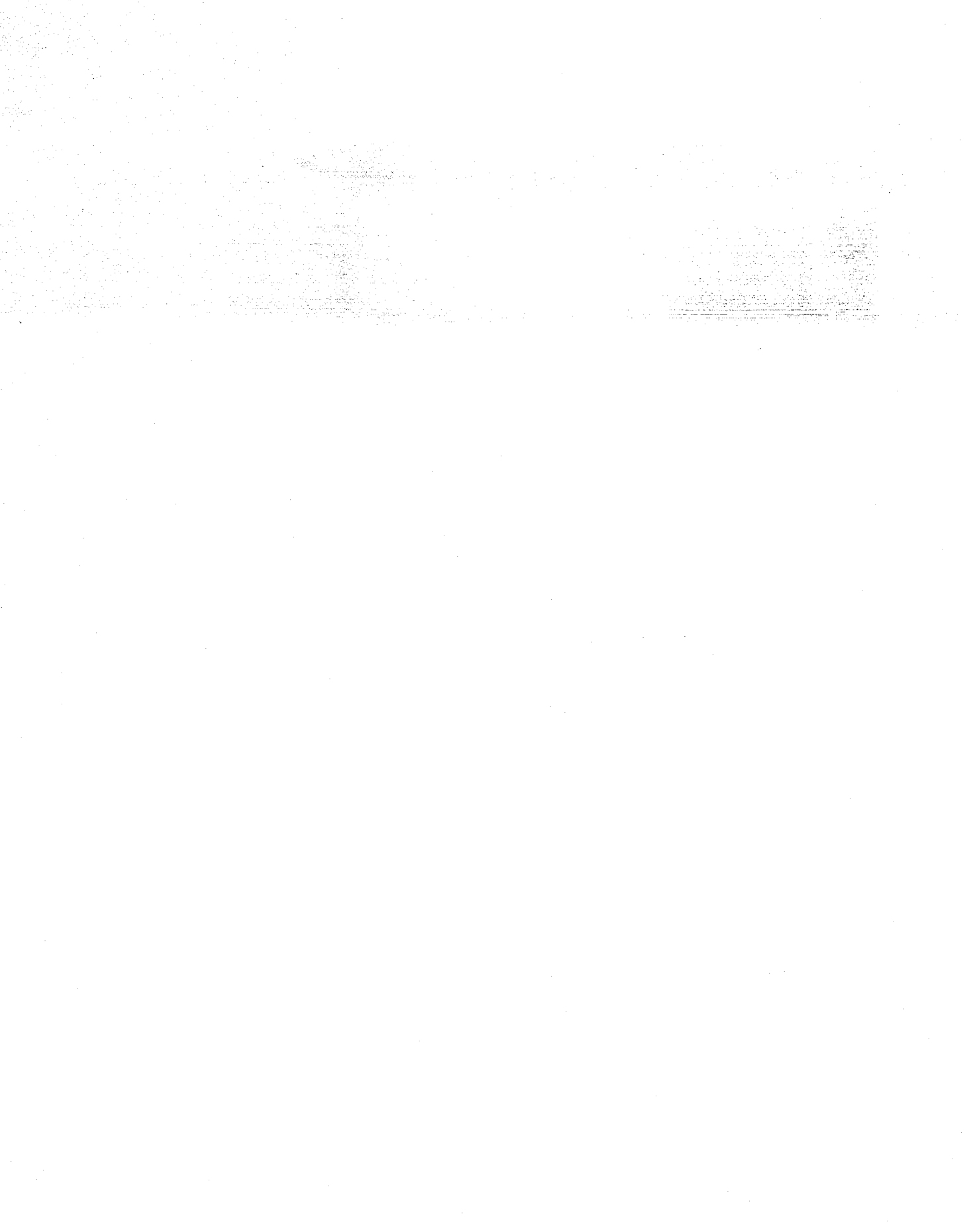
The top half of the page contains two faint, rectangular microphotographs. The left one is larger and shows a dense field of small, bright, refringent vacuoles. The right one is smaller and shows a similar field of vacuoles. Both images are very light and difficult to discern against the white background.

Figura 38. Microfotografias de *H. californiae*. Podemos observar las vacuolas refringentes aún en la presencia de la Naranja de Acridina.




Figura 40. Microfotografía de *H. halobium*. En ella se muestra la distinta morfología de los bacilos en presencia de Naranja de Acridina.

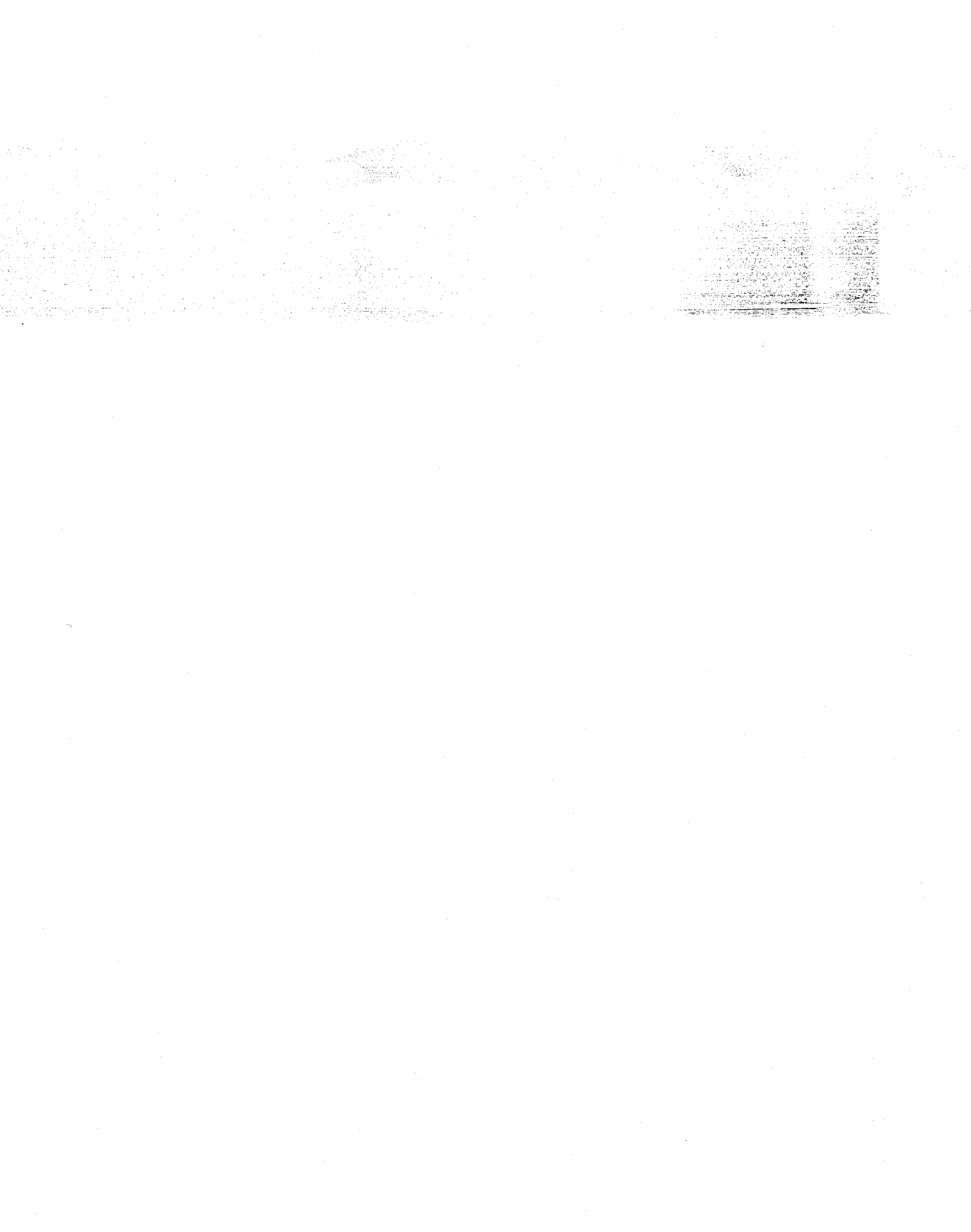
The image area is mostly blank with some faint, illegible markings at the top, likely representing the microphotograph mentioned in the caption.

Figura 41. Microfotografía de *H. morrhuae*. En ella podemos observar la morfología de los bacilos en presencia de Naranja de Acridina.

13. Estudio de la pérdida de plásmidos de *A. morrhuae*, *H. californiae* y *H. halobium* inducida por la Naranja de Acridina.

La pérdida de plásmidos lleva consigo la eliminación de ADN extracromosómico de una estirpe bacteriana. Esta pérdida se puede lograr completamente por diferentes métodos incluyendo el tratamiento con NA (Campbell, 1962).

Basándonos en estos antecedentes, se quiso comprobar si la NA eliminaba los plásmidos de estas especies. Para ello, se cultivaron las especies *A. morrhuae*, *H. californiae*, y *H. halobium* con NA y se realizó el estudio del perfil de plásmidos por el método de Eckardt modificado (apartado 18 de Métodos). Se probaron las siguientes concentraciones de NA (25, 50, 75 y 100 ug/ml) y las electroforesis se realizaron a distintos tiempos (3, 12, 24, 48 y 72 horas).

Gutiérrez y col. (1987) indican que *A. morrhuae* presenta tres plásmidos de peso molecular 300, 280, y 180 Md; *H. californiae* tiene tres plásmidos de peso molecular 120, 100 y menor de 100 Md y *H. halobium* presenta dos plásmidos de peso molecular 115 y menor de 100 Md.

Se observó que, si bien a las tres horas de contacto con la NA los plásmidos permanecen intactos, a partir de las 12 horas de contacto ya no se aprecian estos en ninguna de las electroforesis realizadas a las distintas concentraciones de NA empleadas.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que los plásmidos se eliminan del citoplasma de las bacterias en las

condiciones indicadas, resultados que difieren con los presentados por Moore y McCarthy (1969) que indicaban que el ADN minoritario, aunque es de naturaleza plasmídica, no se eliminaba con el tratamiento con acridina, acriflavina o mitomicina C, debido quizás a que las condiciones experimentales eran muy diferentes.

**CONCLUSIONES**

- 1) Las concentraciones mínimas de Naranja de Acridina para el estudio de la influencia del agente mutagénico son: 50 ug/ml para *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*, y *Halobacterium halobium* y de 100 ug/ml para *Halococcus morrhuae*.
- 2) La temperatura de incubación de *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium*, y *Halococcus morrhuae*, afecta de forma heterogenea en la supervivencia de los cultivos en presencia de Naranja de Acridina.
- 3) La inhibición del crecimiento inducida por la Naranja de Acridina es mayor cuando los cultivos de las especies estudiadas se encuentran en fase exponencial de crecimiento.
- 4) Salvo para *Halobacterium halobium*, el pH del medio de cultivo no influye en la supervivencia de las especies estudiadas en presencia de Naranja de Acridina.
- 5) La concentración de sales del medio de cultivo influye fuertemente en la supervivencia de *Haloarcula californiae* en presencia de la Naranja de Acridina, no así en las otras tres especies estudiadas.
- 6) El fosfato monopotásico no influye en la supervivencia de

*Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*,  
*Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae* en presencia  
de la Naranja de Acridina; no así, el fosfato dipotásico  
que salvo para *Halococcus morrhuae* presenta un efecto  
positivo sobre la inhibición inducida por la Naranja de  
Acridina.

- 7) La supervivencia de las especies estudiadas en presencia de la Naranja de Acridina, no se ve afectada por la mayor o menor concentración de glucosa en el medio de cultivo.
- 8) El consumo de glucosa por las especies estudiadas se ve disminuido en presencia de la Naranja de Acridina y aumenta cuando aumenta la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo.
- 9) La eliminación de la Naranja de Acridina del medio de tratamiento no está influida por la concentración de la glucosa en el medio y es mayor conforme disminuye la concentración del extracto de levadura en el medio.
- 10) La Naranja de Acridina no indujo la obtención de mutantes auxotróficos, ni la utilización de nuevos sustratos en el metabolismo de las especies estudiadas.
- 11) La presencia de la Naranja de Acridina inhibe la utilización de carbohidratos, alcoholes y compuestos



nitrogenados como sustratos habituales en el metabolismo de las especies estudiadas.

12) La Naranja de Acridina induce la pérdida de la resistencia a los antibióticos y metales pesados, a los que son resistentes cada una de las especies estudiadas y en ningún caso se han obtenido nuevas resistencias a los mismos inducidas por el agente mutagénico.

13) La Naranja de Acridina produce variaciones en la morfología y movilidad de las especies estudiadas.

14) La pérdida de plásmidos de las especies estudiadas es eficazmente realizada por la Naranja de Acridina.

15) En el estudio de la influencia de la Naranja de Acridina en la producción y composición de los polisacáridos de *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae* se ha establecido que:

a) El tiempo óptimo de producción de las fracciones extraídas es de 14 días para *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae* y *Halococcus morrhuae* y de 7 días para *Halobacterium halobium*.

b) Se aumenta la producción de los polisacáridos en todas las especies estudiadas menos en *Amoebobacter morrhuae* cuando se cultivan en presencia de Naranja de

Acridina.

- c) La Naranja de Acridina altera la composición de los polisacáridos producidos por *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae*.
- d) Los polisacáridos sintetizados por *Amoebobacter morrhuae*, *Haloarcula californiae*, *Halobacterium halobium* y *Halococcus morrhuae*, contienen básicamente ácidos urónicos, glucosa y galactosa.

## **BIBLIOGRAFIA**

ABARAMSON, H. A., MOPER, L. S. y GORIN M. H. 1942.  
Electrophoresis of proteins an the chemistry of cell  
surfaces. New York: Reinhold Pubtishis Corp.

ADACHI, A. 1968. Effect of acriflavine and 4-nitroquinoleine-  
N-oxide on *Saccharomyces cerevisiae*. Biol, J. Nara.  
Women's uni 18: 12-14

ALBERT, A 1966. The Acridines, their Preparation, Physical,  
Chemical, and Biological Properties and Use, 2nd End.,  
Arnold, London. 604

ALDERSON, T. y KHAN, A. H. 1968. Acridine mutagenesis (in the  
dark) in *Drosophila*. Mutation Res. 5: 147-1 54

ALLISON, A.C. y PATON, G.R. 1945. Chromosome damage in human  
diploid cells following activation of lysosomal enzymes.  
Nature (London) 207: 1170-1173

ALPER, T. y HODGKINS, B. 1969. "Excision repair" and dose-  
modification: questions raised by radiological  
experiments with acriflavine. Mutation Res. 8: 15-23

ALPER, T. FORAGE, A. J. y HODGKINS, B. 1972. Protection of  
normal lysogenic and pyocinogenic strains against

- ultraviolet radiation by bound acriflavine. J. Bacteriol. 110: 823-830
- AMES, B. y WHITFIELD, H. Jr. 1966. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. Cold spring Harbor Symp, Quant. Biol. 31: 221-225.
- ANDERSON, H. 1954. The reddening of salted hides and fish. Appl. Microbiol. 2: 64-69.
- ANTON, J., MESEGUER, I., y RODRIGUEZ-VALERA, F. 1988. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2381-2386.
- ANTON, J. 1989. Exopolisacáridos de *Haloferax mediterranei*. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Universidad de Alicante.
- ARAKATSU, Y. 1971. Action of acriflavine on growth and mutation in yeast. I. Nitrogen, sources affecting the mutation induction. Mutation Res. 12: 235-248.
- ARAKATSU, Y. 1972. Action of acriflavine on the growth and mutation in yeast. II. Kinetic study on the effect of glutamate on the respiration-deficient mutation induction. Mutation Res. 14: 165-184.

AVERS, C. J. y DRYFUSS, C. D. 1965. Influence of added nucleosides on acriflavine induction of petite mutants in baker's yeast. *Nature (London)* **206**: 850

BAAS-BECKING, L. G. M. 1931. Historical notes on salt and salt manufacture. *Sci. Monthly*. **32**: 434-446.

BAGULEY, B. C. y FERGUSON, L.R. 1986. Verapamil modulates mutagenicity of antitumour acridines in bacteria and yeast. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 4581-4584.

BAILEY, S. T. y KUSHNER, D. S. 1964. The ribosomes of the extremely halophilic bacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Mol. Biol.* **9**: 654-669.

BAILEY, S. T. y MORTON, R. A. 1978. Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* **6**: 151-205.

BAILEY, S. T. 1986. Composition of ribosomes an extremely halophilic bacterium. *J. Mol. Biol.* **15**: 420-427

BALCH, W. E., FOX, G. E., MAFRUM, L.J., WOESE, C. R. y WOLFE, R. S. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**: 260-296.

BANNERMAN, E. S., y BILLE, J. 1988. A new selective medium for isolating *Listera* spp. from heavily contaminated material. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 165-167.

BARKER, G. R. y HARMAN, N. 1974. Growth inhibition of *Escherichia coli* by acridine orange and its dependence on pH. *Biochem. Soc. Trans.* 2: 330-333

BARKER, G. R. y HARDMAN, N. 1978. The effects of acridine orange on deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 171 567-573.

BEN-MAHREZ, K., THIERRY, D., SOROKINE, J., DANN-MULLER, A. y KOHIYAMA, M. 1988. Detection of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patient sera. *Br. J. Cancer* 53: 529-534.

BENZER, S. 1961. On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 47: 407-415.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 8ª ED. 1974.

Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. (Eds). Williams y Wilkins. Baltimore.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 1984. Vol 1. Krieg, N. R. y Holt, J. G. (Eds). Williams y Wilkins,

Baltimore.

BERGSTROEM, I., HEINAENEN, A. y SALONEN, K. 1986. Comparison of acridine orange, acriflavina y bisbenzimidazole estirains for enumeration of bacteria in clear and humic waters. Appl. Environ. Microbiol. 51: 664-667.

BERNTHESEN, J. 1978. Annalen. 192: 1

BEUKERS, R. 1965. The effect of proflavine on UV-induced dimerization of thymine in DNA. Photochem. Photobiol. 4: 935-937

BIEN, M. 1972. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* in various phases of the life cycle to induction by acriflavine, I. Influence of culture medium on induction of mutants in haploide culture. Acta Microbiol. Pol. Scr. A, 4: 13-20

BIEN, M. 1972. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* in various phases of the life cycle to induction by acriflavine, II. Induction of mutants by acriflavine in diploid cultures. Acta Microbiol. Pol. Scr. A, 4: 99-106

BLAUROCK, A. E., STOECKENIUS, W., OESTERHELT, D. y SCHERPHOF, G.L. 1976. Structure of the cell envelope of



*Halobacterium halobium*. J. Cell. Biol. 71: 1-22.

BONELO, G., VENTOSA, A., MEGIAS, M. y RUIZ-BERRAQUERO, F.  
1984. The sensitivity of halobacteria to antibiotics.  
FEMS. Microbiol Lett. 21: 341-345.

BOONE, D. R. y MAH, R. A. 1989. Group I Methanogenic  
archaeobacteria. In "Bergey's Manual of Systematic  
Bacteriology. Vol 3". Staley, J. T., Bryant, M. P.,  
Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). p. 2173. Williams y  
Wilkins, Baltimore.

BOWN, A. D. 1964. Aspects of bacterial response to the ionic  
environment. Bacteriol. Rev. 28 :296-329.

BRENNER, S., BENZER, S. y BAERNETT, L. 1958. Distribution of  
proflavine induced mutations in the genetic fine  
structure. Nature (London) 182: 983-988.

BRENNER, S., BARNETT, L., CRICK, F. C. H. y ORGEL, A. 1961.  
The theory of mutagenesis. j. Mol. Biol. 3: 121-124

BROWN, H. J. y GIBBONS, N. E. 1955. The effect of magnesium,  
potassium and iron on the growth and morphology of red  
halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 1: 486-494.

BROWN, A. D. y SHOREY, C. D. 1963. The cell envelopes of two

- extremely halophilic bacteria. J. Cell. Biol. 18: 681-689.
- BROWN, A. D. y CHO, K. Y. 1970. The walls of extremely halophilic cocci: Gram-positive bacteria lacking muramic acid. J. Gen. Microbiol. 62: 267-270.
- BROWN, A. D. 1976. Microbial water stress. Bacteriol. Rev. 40: 803-846.
- BROWNING, C. H. 1937 Chemotherapeutic antiseptics. Edinburgh Med. J. 44: 497-521.
- BROWNING, C. H. 1964. Chemotherapy with antibacterial dyestuffs. In: Experimental Chemotherpy. Vol 2. Schnitzer, R. J. y Hawking, F. (Eds). Academic Press. New York, 1-36
- BRUSICK, D. J. y ZEIGER, E. 1972. A comparison of chemically induced reversion of *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae* mutants, using in vitro plate test,. Mutation Res. 14: 271-275.
- BUCHINGER, G. 1969. The effect of Trypaflavine alone in combination with visible light on cromosomes of HeLa cells and human leukocytes. Humangenetik 7: 323-336.

BUCHINGER, G. 1970. Mutagenicity experiments with mice and human cells cultures: treatment with an acriflavine derivative (tryptaflavine), In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Vogel, F. y Röhrborn, G. (Eds). pp. 350-366. Springer, Heidelberg.

BUIATTI, M. y RAGAZZINI, R. 1966. Mutagenic effect of acridine orange in tomato (*Lycopersicum esculentum*) Mutation Res. 3: 360-361.

CAIRNS, J. 1962. The application of autoradiography to the study of DNA viruses. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27: 311-318.

CAMPBELL, A. M. 1962. Episomes. Adv. Genet. 11: 101-145.

CHAN, L. M. y McCARTER, L. A. 1969. The interaction of aminoacridines with DNA. Biochim. Biophys. Acta. 204: 252-254.

CHAN, L. M. y van WINKLE, Q. 1969. Interaction of acriflavine with DNA and RNA. J. Mol. Biol. 40: 491-493.

CHARLEBOIS, R. L. , LAM, W. L., CLINE, S. W., y DOOLITTLE, W. F. 1987. Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaebacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:

8530-8534.

CLARK, A. M. 1953. The mutagenic activity of dyes in *Drosophila melanogaster*. Am. Nat. 87: 295-305.

CLARK, C. H. 1968. Differential effects of caffeine in mutagen-treated *Schizosaccharomyces pombe*. Mutation Res. 5: 34-40.

CLINE, J. C. y McMAHON, B. E. 1977. Detection of chemical mutagens: use of concentration gradient plates in a high capacity screen. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 16: 523-533.

CLINE, S. W., LAM, W. L., CHARLEBOIS, R. L., SCHALWYK, L. C. y DOOLITTLE, W. F. 1989a. Transformation methods for halophilic archaebacteria. Can. J. Microbiol. 35: 148-152.

CLINE, S. W., SCHALWYK, L. C., y DOOLITTLE, W. F. 1989b. Transformation of the archaebacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. J. Bacteriol. 171: 4987-4991.

COHEN, G. y EISENBER, H. 1969. Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. Biopolimers 8: 45-55.

CRICK, F.H. C., BARNETT, L., BRENNER, S. y WATTS-TOBIN, R. J.  
1961. General nature of the genetic code for proteins.  
*Nature (London)* **192**: 1227-1237.

DAGLEISH, D. G., FUJITA, H. y PEACOCKE, A. R. 1969. Circular  
dichroism of aminoacridines bound to DNA. *Biopolimers* **8**:  
633-645.

D'AMATO, F. 1950. Mutagenic action of acridine and its  
derivatives. *Caryologia* **2**: 229-297.

D'AMATO, F. 1950. Chlorophyll mutations in barley induced by  
acridine derivatives. *Caryologia* **3**: 211-220.

D'AMATO, F. 1952. Mutagenic activity of acridines. *Caryologia*  
**4**: 388-413.

D'AMATO, F. 1954. A survey of acridines for chromosome-  
breaking (mutagenic) action in *Allium*. Proc. 9 th. Int.  
Congr. Genet. 831-835.

DASSARMA, S. RAJBHANDARY, U. L. y KHORANA, G. 1983. High-  
frequency spontaneous mutation in the bacterio-opsin  
gene in *Halobacterium halobium* is mediated by  
transposable elements. *Proc. Natl. Acad. USA.* **80**: 2201-  
2205.

- DAVIES, P. J., EVANS, W. F. y PARRY, J. M. 1975. Mitotic recombination induced by chemical and physical agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 29: 301-314.
- DeMARS, R. I. 1955. The production of phage-related materials when bacteriophage development is interrupted by proflavine. *Virology* 1: 83-99.
- DRAKE, J. W. 1970. The molecular basis of mutation. Holden-Day San Francisco pp. 273.
- DRUMMOND, D. S., SIMPSON-GILDEMEISTER, V. F. W. y PEACOCKE, A. R. 1965. Interaction of aminoacridines with deoxyribonucleic acid: effects of ionic strength, denaturation and structure. *Biopolymers* 3: 135-153.
- DRUMMOND, D. S., PRITCHARD, K. J., SIMPSON-GILDEMEISTER, V. F. W. y PEACOCKE, A. R. 1966. Interaction of aminoacridines with deoxyribonucleic acid: viscosity of complexes. *Biopolymers* 4: 971-987.
- DUNDAS, I. D., SRINIVASAN, V.R. y HALVORSON, H. 1963. A chemically defined medium for *Halobacterium salinarium* strain 1. *Can. J. Microbiol.* 9: 619-624.
- EBERT, K., GOEBEL, W. y PFEIFER, F. 1984. Homologies between

heterogeneous extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new halobacterial isolates. Mol. Gen. Genet. 194: 91-97.

EBERT, W. y GOEBEL, W. 1985. Conserved and variable regions in the chromosomal and extrachromosomal DNA of halobacteria. Mol. Gen. Genet. 200: 96-102.

ELAZARI-VOLCANI, B. 1957. Genus XII. *Halobacterium*. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 7th Ed". Breed, Murray and Smith (Eds). pp. 207-212. Williams y Wilkins, Baltimore.

EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. y CHIMINES, A. M. 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur 76: 351-367.

EPHRUSSI, B., L'HERITIER, P. y HOTTINGUER, H. 1949. Action de l'acriflavine sur les levures, VI. Analyse quantitative de la transformation des populations. Ann. Inst. Pasteur 77: 64-83.

FAHRIG, R. 1970. Acridine-induced mitotic gene conversion (Paramutation) in *Saccharomyces cerevisiae*. The effect of two different modes of binding to DNA. Mutation Res. 10: 509-514.

FAHRING , R. 1973. The genetic activity of aminoacridines: effect of dose and time in the presence and absence of visible light irradiation. *Mutation Res.* 21: 188-189.

FAHRING, R. 1976. Effect of dose and time on the induction of genetic alterations in *Saccharomyces cerevisiae* by aminoacridine in the presence of visible light irradiation in comparison with the dose effect curves of mutagens with other type of action. *Mol. Gen. Genet* 144: 131-140.

FERNANDEZ-CASTILLO, R. 1987. Producción de poli- - hidroxibutirato y mutagénesis química en *Haloferax mediterranei* y otras halobacterias. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

FORAGE, A. J. y ALPER, T. 1973. Evidence for differing modes of interaction of acriflavine with ultraviolet-induced lesions in an *her<sup>r</sup>* bacterial strain. *Mol. Gen. Genet.* 122: 89-100

FORSYTH, M. P. y KUSHNER, D. J. 1970. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 16: 253-261.

FOX, G. E., PECHMANN. K. J. y WOESE, C. R. 1977. Comparative



cataloging of 16S ribosomal RNA: molecular approach to procaryotic systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 44-57.

FOX, G. E., STECKEBRANT, E., HESPELL, R. B., GIBSON, J., MANILOFF, J., DYER, T. A., WOLFE, R. S., BALCH, W. E., TANNER, R. S., MAGRUM, L. J., ZABLEN, L.B., BLAKEMORE, R., GRUPTA, R., BONEN, L., LEWIS, B. J., STAHL, D. A., LUEHRSEN, K. R., CHEN, K. N., y WOESE, C. R. 1980. The filogeny of procariotes. *Science* 208: 457-463.

FRANZMANN, D. E., STEVENSON, P. L., MCMEEDIN, T. A., y BURTON, H. R. 1989. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctic. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 20-27.

GEILHORN, A., ZAIDENWEBER, J., ULTMAN, J. y HIRSCHBERG, E. 1961. The use of atebriane (quinacrine) in the control of recurrent neoplastic effusions. *Dis. Chest.* 39: 165-176.

GHAI, S.K., M. HIAMATSU, A. AMEMURA y T. HARADA. 1981. production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Microbiol.* 122: 33-40

GIBBONS, N. E., y PAYNE, J. I. 1961. Relation of temperature and sodium chloride concentration to growth and morphology of some halophilic bacteria. *Can. J.*

Microbiol. 7: 483-489.

GOCHNAUER, M. B. y KUSHNER, D. J. 1969. Growth and nutrition of halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 15: 1157-1165.

GOCHNAUER, M. B., LEPPARD, G. C., KOMARARAT, P., KATES, M., NORVITSKY, T. y KUSHNER, D. J. 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. and sp. nov. an extremely halophilic actinomycete. Can. J. Microbiol. 21: 1500-1511.

GOD, W. A. y HARTMAN, P. A. 1970. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 104: 601-603.

GODSELL, A. M. y CLARKE, C. H. 1975. Caffeine and quinacrine (Atebrin) as mutagens and antimutagens for spontaneous revertants of achre, missense and frameshift *trp* mutations in *E. coli*. In: Proc. 2nd. Symp. Mol. Genet. Dusimin, N. P. y Goldfarb, D. (Eds). Nanka. Moscow.

GONZALEZ, C., GUTIERREZ, C. y RAMIREZ, C. 1978. *Halobacterium vallismortis* sp. nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 24: 710-715.

GRANT W. D. y ROSS, H. N. M. 1986. The ecology and taxonomy

of halobacteria. FEMS Microbiol. Rev. 39: 9-15.

GRANT, W. D. y LARSEN, H. 1989a. Group III. *Extremely halophilic archaeobacteria* Order Halobacteriales ord. nov. In Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). pp. 2216-2219. Williams y Wilkins, Baltimore.

GRANT, W. D. y LARSEN, H. 1989b. Genus II. *Haloarcula*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). pp. 2224-2226. Williams y Wilkins, Baltimore.

GRANT, W. D. Y LARSEN, H. 1989c. Genus III. *Haloferax*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Staley, J. T., Bryant, M.P., Pfenning, N. y Holt, J.G. (Eds). pp. 2226-2228. Williams y Wilkins, Baltimore.

GRÄSLUND, A., RIGLER, R. y EHRENBERG, A. 1969. Light-induced free radicals in DNA acridine complexes studied by ESR. FEBS Lett. 4: 227-230

GREY , V. L. y FITT, P. S. 1976. An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Microbiol. 22: 440-442.

GU, X. R., NICOGHOSIAN, K., CEDERGREN, R. J. y WONG, J. T. F.

1983. Sequences of halobacterial tARNs, and the paucity of U in the first position of their anticodons. *Nucleic Acids Res.* 11: 5433-5442.
- GUPTA, R., LANTER, J. M. y WOESE, C. R. 1983. Sequence of the 16S ribosomal RNA from *Halobacterium volcanii*, an archaeobacterium. *Science* 221: 656-659.
- GUPTA, R. 1981. Structural characterization of the transfer ribonucleic acids from *Halobacterium volcanii* and other archaeobacteria, Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana-Champaign.
- GUPTA, R. 1985. Transfer acids of archaeobacteria. In: "The bacteria. Vol III: Archaeobacteria". Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (Eds). Academic. Press. Orlando.
- GUTIERREZ, M. C., GARCIA, M. T., VENTOSA, A., NIETO, J. J. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1986. Ocurrence of megaplasmids in halobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 67-71.
- HARRISON, F. E. y KENNEDY, M. E. 1922. The red discoloration of cured cod-fish. *Trans. Roy. Soc. Canada. Sect. V* 16: 101-152.
- HERBOLD, B. y BUSELMAIER, W. 1976. Induction of point mutations by different chemical mechanisms in the liver microsomal assay. *Mutation Res.* 40: 73-84.

HERBOLD, B., BUSELMAIER, W. y RÖHRBORN, G. 1976. Critical survey on liver microsome test a system for detecting point mutations. *Arzneim. Forsch.* 25: 1705-1707.

HERBOLD, B. A., RÖHRBORN, G. y BUSELMAIER, W. 1977. Point-mutation research, relevance for humans. *J. Toxicol. Environ. Health* 2: 1183-1191.

HERSON, D. S., MARTHI, B., PAYER, M. A. y BAKER, K. H. 1986. Enumeration of chlorim-stressed organisms with acridine orange 2-(p-iodo-phenyl)-3-(p-nitrophenyl)tetrazolium chloride (AOINT). *Curr. Microbiol.* 13: 77-80.

HIROTA, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 46: 57-64.

HOUWINK, A. L. 1956. Flagella, gas vacuoles and cell-walls structure in *Halobacterium halobium*; an electron microscope study. *J. Gen. Microbiol.* 15: 146-150.

IMADA, M., INOVYE, M., EDA, M. y TSUGITA, A. 1970. Frameshift mutation in the lysozyme gene of bacteriophage T4: demonstration of the insertion of four bases and the preferential occurrence of base addition in acridine mutagenesis. *J. Mol. Bio.* 54: 199-217.

IMHOFF, J. F. y TRÜPER, H. G. 1977. *Ectothiorhodospira halochloris* sp.nov. a new extremely halophilic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch Microbiol. 114: 115-121.

IMHOFF, J. F., SAHL, H. G., SOLIMAN, G. S. H. y TRÜPER, H. G. 1979. The Wadi Natrum: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. Geomicrobiol. 1: 219-234.

INGRAM, M. 1957. Microorganisms resisting high concentrations of sugars or salt. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 7: 90-133.

IZOTOVA, L.N., STERKIN, V. E., LYUNBLINSTAYA, V. I., TIMOKHINA, E. A. y STEPANOV, V. M. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 155: 826-830.

JAVOR, B., REGUADT, C. y STOECKENIUS, W. 1982. Box-shaped halophilic bacteria. J. Bacteriol. 151: 1532-1542.

JAVOR, B. 1984. Growth potential of halophilic bacteria isolated from solar salt environments: carbon sources and salt requirements. Appl. Environ. Microbiol. 48: 352-360.

- JOHNSON, H. G. y BACH, M. K. 1969. Aparent anti-mutagenic activity of quinacrine hydrochloride in Detroit-98 human sternal marrow cells grow in culture. *Cancer Res.* 29: 1367-1370.
- JOSHI, J. G., GUILD, W. R. y HANDLER, P. 1963. The presence of two species of DNA in some halobacteria. *J. Mol. Biol* 6: 34-38.
- JUEZ, G. y RODRIGUEZ-VALERA, F. 1984. A mutant of *Halobacterium halobium* constitutive production of bacteriorhodopsin. *FEMS Microbiol. Lett.* 23: 167-170.
- JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A. y KUSHNER, D. J. 1986. *Haloarcula hispanica* sp. nov. and *Haloferax gibonsi* two new specie of extremely halophilic Archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 75-79.
- KANDLER, O. 1982. Cell wall structures and their phylogenetic implications. *Zbl. Akt. Hyg. Abt. I, Orip.* C3: 149-160.
- KANDLER, O. 1984. Archaeobacteria-biotechnological implications, *Biotechnology. Symposium: Futuristic Aspects of Biotechnology.* Minchen, 1984.
- KAPLAN, R. W. 1949. Mutations by photodynamic action in *Bacterium prodigiosum*. *Nature (London)* 163: 573-574.

KATES, M. 1972. Ether-linked lipids in extremely halophilic.  
In: "Ether Lipids: Chemistry and Biology". Snyder, F.  
(Ed). pp. 351-398.

KATES, M. 1978. The phytanyl ether-linked polar lipids and  
isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic  
bacteria. Prog. Chem. Fats Other Lipids 15: 301-342.

KATES, M. y KUSHWAHA, S. C. 1978. Biochemistry of lipids of  
extremely halophilic bacteria. In: "Energetics and  
structure of halophilic microorganisms". Caplan, S. R. y  
Ginzburg, M. (Eds). pp. 461-480. Elsevier/North-  
Holland, Biochemical Press, Amsterdam.

KATO, H 1974. Induction of sister chromatid exchanges by  
chemical mutagens and its possible revelance to DNA  
repair. Exp. Cell. Res. 85: 239-247.

KATZNEELSON, H. y LOCHHEAD, A. G. 1952. Growth factor  
requirements of halophilic bacteria. J. Bacteriol.  
64: 97-103.

KELLY, M. y LIAAEN-JENSEN, S. 1967. Bacterial carotenoides  
XXVI. C50-carotenoids. II. Bacterioruberin. Acta. Chem.  
Scand. 21: 2578.

KELLY, M., NORGDARD, S. y LIAAEN.JENSEN, S. 1970. Bacterial



carotenoids XXXI. C50-carotenoids. V. Carotenoids of *Halobacterium salinarium* specially bacterioruberin. Acta Chem. Scand. 21: 2169.

KESSEL, M. y COHEN, Y. 1982. Ultraestructure of square bacteria from a brine pool in Southern Sinai. J. Bacteriol. 150: 851-860.

KIHLMAN, B. A., STURELID, S., PALETTI, F. y BECCHETTI, A. 1977. Effects of caffeine, an inhibitor of post-replication repair in mammalian cells, on the frecuencies of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by mutagenic agents. Mutation Res. 46: 130-131.

KIM, E. K. y FITT, P. 1977. Partial purification and properties of *Halobacterium cutirubrum* L-alanina dehydrogenase. Biochem. J. 161: 313-320.

KIRK, R. G. y GINZBURG, M. 1972. Ultrastructure of two species of *Halobacterium*. J. Ultrastruct. Res. 41: 80-94.

KLAUSNER, A. 1986.- Algculture: Food for thoght. Biotchnol. 4: 947-953.

KLECKNER, K. 1981. Transposables elements in procaryotes.

- Annu. Rev. Genet. 15: 314-318.
- KOCH, R. E. y DRAKE, J. W. 1973. Ligase-defective bacteriophage T4. Part I. Effects on mutation rates. J. Virol. 11: 35-40.
- KOCUR, M., SMID, B. y MARTINEC, T. 1972. The fine structure of extreme halophilic cocci. Microbios. 5: 101-107.
- KOCUR, M. y HODGKISS, W. 1973. Taxonomic status of the genus *Halococcus*. Schoop. Int. J. Syst. Bacteriol. 23: 151-156.
- KOHNO, T. y ROTH, J. R. 1974. Proflavine mutagenesis of bacteria. J. Mol. Biol. 89: 17-32.
- KÖNIG, H. y STETTER, K.O. 1989a. Archaeobacteria. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 3. Staley, J T., Bryant, M. P.; Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). pp. 2171-2173.
- KÖNIG, H. Y. y STETTER, K. O. 1989b. Group V. Extremely thermophilic S<sup>o</sup>-metabolizers, In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol 3. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). p. 2236. Williams y Wilkins, Baltimore.

KORGAONKAR, K. S. y SUKHATANKAR, J. V. 1963. Anti-tumor activity of the fluorescent dye, acridine orange, on Yoshida Sarcoma (ascites). Eur. J. Cancer 17: 471-473.

KRAMER, J. K. G., KUSHWAHA, S. C. y KATES, M. 1972. Structure determination of the squalene, dihydrosqualene and tetrahydrosqualene in *Halobacterium cutirubrum* Biochem. Biophys. Acta. 270: 103-110.

KUCHINO, Y., IHARA, M., YABUSAKI, Y. y NIHIMURA, S. 1982. Initiators tARNs from archaebacteria show common unique sequence characteristics. Nature 298: 684-685.

KUSHWAHA, S. C. y KATES, M. 1973. Isolation and identification of "bacteriorhodopsin and minor C40-carotenoids in *Halobacterium cutirubrum* Biochem. Biophys. Acta. 316: 235-243.

KUSHWAHA, S. C., GOCHNAUER, M. B., KUSHNER, D. J. y KATES, M. 1974. Pigmentes and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 20: 241-245.

KUSHWAHA, S. C., KRAMER, J. K. G. y KATES, M. 1975. Isolation and characterization of C50-carotenoids pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum*. Biochem. Biophys. Acta 398: 303-314.

KUSHWAHA, S. C. y KATES, M. 1978. 2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerol and phenols from extremely halophilic bacteria. *Phytochemistry* 17: 2029-2032.

KUSHWAHA, S. C., JUEZ-PEREZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., KATES, M. y KUSHNER, D. J. 1982. Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Can. J. Microbiol.* 28: 1365-1372.

KUSHWAHA, S. C., KATES, M., JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F. y KUSHNER, D. J. 1982. Polar lipids of an extremely halophilic bacterial strain (R-4) isolated from salt ponds in Spain. *Biochem. Biophys. Acta* 711: 19-25.

KUSHNER, D. J. 1964. Lysis and dissolution of cells and envelopes an extremely halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 87: 1147-1156.

KUSHNER, D. J. y ONISHI, H. 1968. Absence of normal cell wall constituents from the outer layer of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem.* 46: 997-998.

KUSHNER, D. J. 1978. Life in high salt and solute concentrations. Halophilic bacteria. In: "Microbial life in extreme environments". Kushner, D. J. (Eds). Academic Press. New York.

KUSHNER, D. J. 1980. Extreme environments. In: "Contemporary microbial ecology". Elwood, D. C., Hedger, J. N., Lathan, M. J., Slater, J. H. y Linch, J. M. (Eds). pp. 29-54. Academic Press. London.

KUSHNER, D. J. 1985. The Halobacteriaceae. In: "The bacteria. Vol VIII: Archaeobacteria". Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (Eds). Academic Press. Orlando.

LAKE, J. A., HENDERSEN, E., OAKES, M. y CLARK, M. W. 1984. Eocytes: a new ribosome structure indicate a kingdow with close relationship to eukariotes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 3786-3790.

LAKE, J. A. 1986. An alternative to archaeobacterial dogma. Nature 319: 626.

LAKE, J.A. 1988. Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. Nature 331: 184-186.

LAKE, J. A. 1989. Origin of eukaryotic nucleus: eukaryotes and eocytes are genotipically related. Can. J. Microbiol. 35: 190-198.

LANGWORTHY, T. A. 1985. Lipids of archaeobacteria. In: "The bacteria. Vol VIII: Archaeobacteria". Woese, C. R. y

- Wolfe, R. S. (Eds). Academic Press, Orlando.
- LANGWORTHY, T. A. y POND, J. L. 1986. Archaeobacterial other lipids and chemotaxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 253-257.
- LANGWORTHY, T. A. y SMITH, P. F. 1989. Group IV. Cell wall-less archaeobacteria. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3". Staley, J. T., Bryant M. P., Pfennig, N. y Holt, J. G. (Eds). pp. 2233-2236. Williams y Wilkins, Baltimore.
- LARSEN, H. 1962. Halophilism. In: "The bacteria. Vol IV. The physiology of growth". Gunsalus, I. C. y Stainer, R. Y. (Eds). pp. 297-342. Academic Press. London.
- LARSEN, H. 1967. Biochemical aspects of extreme halophilims. *Adv. Microbiol. Physiol.* 1: 97-132.
- LARSEN, H. 1973. The Halobacteria's Confusion to Biology. *Antonie van Leeuwenhoek* 39: 383-396.
- LARSEN, H. 1984. Halobacteriaceae. In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1". Krieg, N. R. y Holt, J. G. (Eds). pp. 261-267. Williams y Wilkins, Baltimore.
- LARSEN, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganism an

overview and historical perspective. FEMS Microbiol.  
39: 1-4

LASNITZKI, I. y WILKISON, J. H. 1948. The effect of acridine derivatives on growth and mitosis of cells in vitro. Br. J. Cancer 11: 369-375.

LATT, S. A., BRODIE, S. y MUNROE, S. H. 1974. Optical studies of complexes of quinacrine with DNA and chromatin implications for the fluorescence of cytological chromosome preparations. Chromosoma 49: 17-40.

LEFFERS, H. y GARRET, R. 1984. The nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of the archaebacterium *Halococcus morrhuae*. EMBO J. 3: 1613-1619.

LERMAN, L. S. 1961. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. J. Mol. Biol. 3: 18-30.

LERMAN, L. S. 1961. The structure of the DNA-acridine complex. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 49: 94-102.

LERMAN, L.S. 1964. Amino group reactivity in DNA-acridine complexes. J. Mol. Biol. 10: 367-380.

LERMAN, L.S. 1964. Acridine mutagens and DNA structure. J.

Cell. Comp. Physiol. 64: 1-18.

LOPEZ-BREA, M., BAQUERO, M., JIMENEZ, M. L., ENRIQUEZ, A. y DIEZ, C. 1985. Early detection of *Neisseria meningitidis* in blood cultures by acridine orange staining. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79: 558.

LUZZATI, U., MASSON, F. y LERMAN, J. S. 1961. Interaction of DNA and proflavine: a small-angle X-ray scattering study. J. Mol. Biol. 3: 634-639.

MADON, J. LESER, V. y ZILLIG, W. 1983. DNA-dependent RNA polymerase from the extremely halophilic archaeobacterium *Halococcus morrhuae* Eur. J. Biochem. 135: 279-283.

MAGNI, G. E., von BORSTEL, R. C. y SOR, A. S. 1964. Mutagenic action during meiosis and antimutagenic action during mitosis by 5-aminoacridine in yeast. Mutation Res. 1: 227-230.

MAJUNDAR, S. y CHADRA, A. K. 1985. UV-repair and mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*: I. Repair of UV-induced damages. Zentralbl Mikrobiol. 40: 247-254.

MAJUNDAR, S. y CHANDRA, A. K. 1985. UV-repair and mutagenesis in *Azotobacter vinelandii*. II. Repair and mutagenesis. Zentralbl Mikrobiol. 140: 255-258.



MATHESON, A. T., SPROTT, G. D., MACDONALD, I.J. y TESSIER, H.  
1976. Some properties of an unidentified halophilic:  
growth characteristics, internal salt concentration, and  
morphology. Can. J. Microbiol. 22: 780-786.

MATHESON, A. T. y YAGUCHI, M. 1982. The evolution of the  
archaebacterial ribosome. Zbl. Bakt. Mik. Hyg. Abt. I  
Orig. C3: 192-199.

MAY, B. P. y DENNIS, P. P. 1987. Superoxide dismutase from  
the extremely halophilic archaebacterium *Halobacterium*  
*cutirubrum*. J. Bacteriol. 169: 1417-1422.

MESCHER, M. F., STROMINGER, J.L y WATSON, S. W. 1974. Protein  
and carbohydrate composition of the cell envelope of  
*Halobacterium salinarium*. J. Bacteriol. 120: 945-954.

MESCHER, M. F. y STROMINGER, J. L. 1976. Structural (shape-  
maintaining) role of the cell surface glycoprotein of  
*Halobacterium salinarium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.  
73: 2687-2691.

MESCHER, M. F. y STROMINGER, J. L. 1976. Purification and  
characterization of a prokaryote glycoprotein from the  
cell envelope of *Halobacterium salinarium*. J. Biol.  
Chem. 251: 2005-2014.

- MEVARECH, M. y WERCZBERGER, R. 1985. Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. J. Bacteriol. 162: 461-462.
- MOORE, R. L. y MCCARTHY, B. J. 1969. Characterization of the deoxiribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. J. Bacteriol. 99: 248-254.
- MOORE, W. E. C., CATO, E. P. y MOORE, L. V. H. 1985. Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of systematic Bacteriology since the 1980 approved list of bacterial names. (1 January to 1 January 1985) Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 382-407.
- MOORE, W. E. C. 1986. Validation of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 382-407.
- MULLAKHANBHAI, M. F. y FRANCIS, G. W. 1972. Bacterial lipids of a moderately halophilic bacterium. Acta Chem. Scand. 26: 1399.
- MULLAKHANBHAI, M. F. y LARSE, H. 1975. *Halobacterium volcanii* sp. nov. a Dead Sea *Halobacterium* with a moderate salt requirements. Arch. Microbiol. 104: 207-214.

MURAKAMI, A. 1972. Acridine orange mutagenesis in silkworm.  
Jpn. J. Genet. 47: 331-334.

MURAKAMI, A. 1973. Mutagenesis of acridine orange in mitotic  
cleavage nucleic of the silkworm, *Bombyx mori*. Mutation  
Res. 20: 67-70.

MURAKAMI, A. 1974. Mutagenic activity of quinacrine  
hydrochloride in the silkworm. Mutation Res. 22: 295-  
297.

NAGAI, S., YANAGISHIMA, N. y NAGAI, H. 1961. Advances in the  
study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast  
and other microorganisms Bacteriological Rev. 25: 404-  
426.

NAGAI, S. 1963. Methylene blue and toluidene blue interfering  
with the production of respiration-deficient mutants in  
yeast by acriflavine. Exp. Cell. Res. 29: 82-85.

NAKAMURA, H. y SHINYA, T. 1985. Acriflavine-binding capacity  
controlled by the *acrA* gene of *Escherichia coli*. J.  
Gen. Microbiol. 131: 1639-1647.

NAKAMURA, H. 1965. Gene-controlled resistance to acriflavine  
an other basic dyes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol.  
90: 814.

NAKAMURA, H. 1966. Acriflavine-binding capacity of *Escherichia coli* in relation to acriflavine sensitivity and metabolic activity. *J. Bacteriol.* **92**: 1447-1452.

NAKAMURA, H. 1967. Changes in sensitivity to acriflavine of *Escherichia coli* grown in media of different glucose contents. *J. Gen. Microbiol.* **49**: 443-449.

NAKAMURA, H. 1967. Phenethyl alcohol sensitivity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**: 1183-1184.

NAKAMURA, H., SUGANUMA, A. y GREENBERG, J. 1975. Effect of inorganic phosphate on acridine inhibition and plasmid curing in *Escherichia coli*. *J. Gen Microbiology* **91**: 45-52.

NASTASI, M., MORRIS, J. M., RAINER, D. M., SELIGY, U. L., SZABO, A.G., WILLIAMS, D. F., WILLIAMS, R. E. y YIP, R. W. 1976. Structural implications of the electronic spectra of quinacrine-deoxyribonucleic acid complexes in the ultraviolet region (250-300nm). *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 3979-3986.

NASTASI, M., YIP, R. W., SELIGY, U. L., SZABO, A. G. y WILLIAMS, R. E. 1976. Exciton-like splitting: a diagnostic for acridine dye-nucleic acid complexes. In:

- Excited States of Biological Molecules. Birks, J. (Ed).  
Wiley, New York pp. 233-242.
- NEVILLE Jr., D. M. y DAVIES, D. R. 1966. The interaction of  
acridine dyes with DNA: an X-ray diffraction and optical  
investigation. *J. Mol. Biol.* 17: 57-74.
- NEWTON, A., MASYS, D., LEONARD, E. y WYGAL, D. 1972.  
Association of induced frameshift mutagenesis and DNA  
replication in *E. coli*. *Nature*. (London) 236: 19-22.
- NISHINO, S. F. 1986. Direct acridine orange counting of  
bacteria preserved with acidified Lugol Iodine. *Appl.*  
*Environ. Microbiol.* 52: 602-604.
- NISSENBAUM, A. 1975. The microbiology and biogeochemistry of  
the Dead Sea. *Microbiol. Ecol.* 2: 139-161.
- NORVITSKY, T. S. y KUSHNER, D. J. 1975. Influence of  
temperature and salt concentration on the growth of a  
facultatively halophilic *Micrococcus* sp. *Can. J.*  
*Microbiol.* 21: 107-110.
- NUTI-RONCHI, V. y D'AMATO, F. 1961. New data on chromosome  
breakage by acridine orange in the *Allium* tets.  
*Caryologia* 14: 163-192

OESTERHELT, D. y KRIPPAHL, G. 1983. Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann. Microbiol.* 1343: 137-150.

OLIVER, J. L., AMILS, R. y MARIN, A. 1987. Inferring the phylogeny of archaebacteria: the use of ribosomal sensitivity to protein synthesis inhibitors. *J. Mol. Evol.* 24: 281-288.

OLSEN, G. J. y WOESE, C. R. 1989. A brief note concerning archaebacterial phylogeny. *Can. J. Microbiol.* 35: 119-123

ONISHI, H McCANCE, M.E. y GIBBONS, N. E. 1965. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 11: 365-373.

OREN, A. 1983. *Halobacterium sodomense* sp. nov. , a Dead Sea *Halobacterium* with an extremely high magnesium requirement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 381-386.

ORGEL, A. y BRENNER, S. 1961. Mutagenesis of bacteriophage T4 by acriflavines. *J. Mol. Biol.* 3: 762-768.

ORGEL, L. E. 1965. The chemical basis of mutation. *Adv. Enzymol.* 27: 289-346.

OSTERTAG, W. y KERSTEN, W. 1965. The action of proflavine and actinomycin D in causing chromatid breakage in human cells. *Exp. Cell. Res.* **39**: 296-301.

PARKES, K. y WALSBY, A. E. 1981. Ultrastructure of gas-vacuolate square bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 503-506.

PATEREK, J. R. y SMITH, P. H. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov., sp. nov., a methylotrophic methanogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 122-123.

PEACOCKE, A. R. y SKERRETT, J. N. H. 1956. The interaction of aminoacridines with nucleic acids. *Trans. Faraday Soc.* **52**: 261-279.

PEACOCKE, A. R. 1973. The interaction of acridines with nucleic acids. In: *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. Vol 9. Acheson, R. M. (Ed). Acridines, Interscience, New York. pp. 723-757.

PENSO, G. 1947. Il rosso der baaccalari-Etiologia, commestibilita bonificial e prevenzione. *Rend. Ist. Super Sanita.* **10**: 563-605.

PEREZ-FILLOL, M., RODRIGUEZ-VALERA, F. y FERRY, J. G. 1985.

Isolation of methanogenic bacteria able to growth in high salt concentration. *Microbiologia* 1: 29-33.

PERRY, P. y EVANS, H. J. 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature (London)* 258: 121-125.

PETTER, H. F. 1931. On bacteria of salted fish. *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. Amsterdam Scr. C.* 34: 1417.

PETTER, H. F. M. 1932. Over roode on andere Bacterien van gazonten Visch. Ph. D. Thesis. University of Utrecht Netherland.

PFEIFER, F., WEIDINGER, G. y GOEBEL, W. 1981. Genetic variability in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 145: 375-381.

PFEIFER, F., WEINDINGER, G. y GOEBEL, W. 1981. Characterization of plasmids in halobacteria. *J. Bacteriol.* 145: 369-374.

PFEIFER, F., EBERT, K., WEIDINGER, G. y GOEBEL, W. 1982. Structure and functions of chromosomal DNA in halobacteria. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I. Orig. C3*: 110-119.



PFEIFER, F., FRIEDMAN, J., BOYER, H. W. y BETLACH, M. 1984.  
Characterization of insertions affecting the expression  
of the bacterio-opsin gene in *Halobacterium halobium*  
Nucleic Acid Res. 12: 2489-2497.

PFEIFER, F., BOYER, H. W. y BETLACH, M. C. 1985. Restoration  
of bacterio-opsin gene expression in a revertant of  
*Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 164: 414-420.

PFEIFER, F. 1988. Genetics of halobacterias. In: "Halophilic  
Bacteria. Vol II". Rodríguez-Valera, F. (Ed). CRC  
Press. Inc. Boca Raton, Florida.

POPESCU, N. C., TURBULL, D. y DIPAOLO, J. A. 1977. Sister  
chromatide exchange and chromosome aberration analysis  
with the use of several carcinogens and non-carcinogens.  
J. Natl. Cancer Inst. 59: 289-293.

PUGLISI, P.P. 1967. Mutagenic and antimutagenic effects of  
acridium salts in yeast. Mutation Res. 4: 289-294.

PRITCHARD, N. J., BLAKE, A. y PEACOCKE, A. R. 1966. Modified  
intercalation model for the interaction of  
aminoacridines and DNA. Nature (London) 212: 1360-1361.

RAMOS, A., VALLIN, C., JOSEPH, H., VISOZO, A., PEREZ, D.,

- ALONSO, E., VILLANUEVA, F y RODRIGUEZ, R. 1986. Enhancement of oxytetracycline production in a *Streptomyces rimosus* strain after treatment with acriflavine. *Biotechnol. Lett.* 8: 161-162.
- RAMOS-CORMENZANA, A. 1989. Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. In: "Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology". Da Costa, M. S., Duarte, J. C., y Williams, R. A. D. (Eds). pp. 289-309. Elsevier, London.
- RAYMOND, J. C. y SISTROM, W. R. 1969. *Ectothiorhodospira halophila* new species of genus *Ectothiorhodospira*. *Arch. Microbiol.* 69: 121-126.
- REISTAND, R. 1975. Amino sugar and amino acid constituents of the cell walls of the extremely halophilic-cocci. *Arch. Microbiol.* 102: 71-73.
- ROBERTSON, J. D., SCHEREIL, W. y REEDY, M. 1982. *Halobacterium halobium* I: a thin-sectioning electron-microscopic study. *J. Ultrastruct. Res.* 80: 148-162.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. y RUIZ-BERRAQUERO, F. 1983. Halobacterias. *Investigación y Ciencia* 80: 94-102.

RODRIGUEZ-VALERA , F., JUEZ, G. y KUSHNER, D. J. 1983.  
*Halobacterium mediterranei* sp. nov. a new carbohydrate-  
utilizing extreme halophile. Syst. Appl. Microbiol.  
4: 369-381.

RODRIGUEZ-VALERA, F. 1986. The ecology and taxonomy of  
aerobic chemoorganotrophic eubacteria. FEMS Microbiol.  
Rev. 39: 17-22.

RODRIGUEZ-VALERA, F. 1988. Characteristics and microbial  
ecology of hipersaline environments. In: "Halophilic  
Bacteria. Vol I" Rodriguez-Valera, F. (Ed). CRC Press,  
Inc. Boca Raton, Florida.

ROSENKRANZ, H. S. 1973. Micracil D: Inhibition of  
deoxyribonucleic acid polymerase-dependient *Escherichia*  
*coli*. Antimicrob. Agents Chemotherapy. 3: 530-531.

ROSS, H.N.M. y GRANT, W. D. 1985. Nucleic acid studies on  
halophilic Archaeobacteria. J. Gen. Microbiol. 131: 165-  
173.

ROSS, H. N. M., GRANT, W. D. y HARRIS, J. E. 1985. Lipids in  
Archaeobacteriae taxonomy. In: "Chemical methods in  
bacterial systematic". Goodfellow, M. y Minnikin, D. E.  
(Eds). Academic Press, London.

RUBINONTZ, C. y SHILOACH, J. 1985. Insulin-related material in prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 29: 53-58.

RUIZ, C., MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1989. Modification of immune response by extreme halophilic bacteria. In: "Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology". Da Costa, M. S. Duarte, J. C. y Williams, R. A. D. (Eds). Elsevier, London. pp. 367-370.

SAPIENZA, C., ROSE, M. R. y DOOLITTLE, W. F. 1982a. High-frequency genomic rearrangements involving archaeobacterial repeat sequence elements. Nature (London) 229: 182-185.

SAPIENZA, C., ROSE, M. R. y DOOLITTLE, W. F. 1982b. Unusual physical organization of the *Halobacterium* genome. Nature. (London) 295: 384-389.

SARABHAI, A. y LAMFROM, H. 1969. Mechanism of proflavine mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 63: 1196-1197.

SAVAGE, J. R. K., BIGGER, T. R. L. y WATSON, G. E. 1976. Location of quinacrine mustard-induced chromatid exchange points in relation to ASG bands in human chromosomes. Chromosomes Today 5: 281-291.

SCHINZEL, R. y BURGER, K. J. 1986. A site-specific endonuclease activity in *Halobacterium halobium*. FEMS Microbiol. Lett. 37: 325-329.

SCHALAMMADINGER, J. y SZABO, G. 1974. Effect of quinacrine on the expression of Lac operon in *Escherichia coli* promoter mutants. Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung 9: 295-301.

SCHNABEL, H., ZILLIG, W., PFAFFLE, M., SCHNABEL, R., MICHEL, H. y DELIUS, H. 1982. *Halobacterium halobium* phage OH. EMBO J. 1: 87-92.

SCHOLTISSEK, C. y BOTT, R. 1964. Binding of proflavine to deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid and its biological significance. Nature (London) 204: 39-43.

SCHOOP, G. 1935. *Halococcus litoralis*, ein obligat halophiles. Farbstoffbildner. DTSCH. Tierarztl. Wochenschr. 43: 69-81.

SCHREIBER, J. P. y DAUNE, M. P. 1974. Fluorescence of complexes of acridine dye with synthetic polydeoxyribonucleotides: a physical model of frameshift mutation. J. Mol. Biol. 83: 485-501.

SCOTT, B. R. 1976. Failure to detect a mutagenic activity of 8-methoxyprovalen (in the dark) in strain of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mutation Res.* 40: 167-168.

SEHGAL, S. N., KATES, M. y GIBBONS, N. E. 1962. Lipids of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 69-81.

SEILER, J. P. 1977. Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens. Preliminary results in the validation of a novel short term test. *Mutation Res.* 46: 305-310.

SESNOWITZ-HORN, S. y ADELBERG, A. E. 1968. Proflavine treatment of *Escherichia coli*: generation of frameshift mutations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33: 393-402.

SETLOW, J. K. y SETLOW, R. B. 1967. Contribution of dimers containing cytosine to ultra-violet inactivation of transforming DNA. *Nature (London)* 213: 907-909.

SETLOW, R. B. CARRIER, W. L. 1967. Formation and destruction of pyrimidine dimers in polynucleotides by ultraviolet irradiation in the presence of proflavine. *Nature (London)* 213 : 906-907.

SHIVELY, J. M. 1974. Inclusion bodies of prokaryotes.

Ann. Rev. 28: 167-187.

SIEWERT, G. y Strominger, J. L. 1967. Bacitracin: an inhibitor of the dephosphoritation of lipid pyrophosphate, an intermediate un biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Biochemistry 57: 767-773.

SILVER, S. 1967. Acridine sensitivity of bacteriophage T2: a virus gene affecting cell permeability. J. Mol. Biol. 29: 191-202.

SILVER, S. LEVINE, E. y SPIELMAN, PH. 1968. Acridine binding by Escherichia coli: pH dependency and strain differences. J. Bacteriol. 95: 333-339.

SIMON, R. D. 1978. *Halobacterium* strain 5 contains a plasmid wich is correlated with the presence of gas vacuoles. Nature (London) 273: 314-317.

SINGH, U. P. 1970. Photodynamic inactivation and reversion in *Fusarium* species with acriflavine. Experientia. 26: 547.

SINGH, U. P. 1973. Effect of acriflavine on UV-induced

- mutants of *Fusarium* species. Mycopathol. Mycol. Appl. 50: 183-193.
- SIVARAJA IYER, S. R. y SINGH. G. S. 1973. Interaction of acridine dyes with DNA. Stud. Biophys. 39: 81-88.
- SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V. y SNEATH, P. H. A. 1980. Approved list of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420.
- SMALLBONE, B. W. y KATES, M. 1981. Structural identification of minor glycolipids in *Halobacterium cutirubrum*. Biophys. Acta. 663: 551-557.
- SOLIMAN, G. S. H. y TRØPER, H.G. 1982. *Halobacterium pharaonis* sp. nov. a new extremely archaebacterium with low magnesium requirement. Zbl. Bak. Abt. I. Orig. C3: 318-329.
- SOLOMON, E. y BOBROW, M. 1975. Sister chromatid exchanges: a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. Mutation Res. 30: 273-278.
- SPUDICH, E. N. y SPUDICH, J. L. 1982. Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 4308-4312.



STEBER, J. y SCHLEIFER, K. H. 1975. *Halococcus morrhuae*: a sulfated heteropolysaccharide as the structural component of the bacterial cell wall. Arch. Microbiol. 105: 173-177.

STEENSLAND, H. y LARSEN, H. 1969. A study of the cell envelope of the halobacteria. J. Gen. Microbiol. 55: 325-336.

STETTER, K. O. 1989. Group II. Archaeobacterial sulfate reducers. Order "Archaeoglobales". In: "Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol 3". staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning, N. y Holt, J. G. (Eds). Williams y Wilkins, Baltimore. p. 2216.

STEWART, C. R. 1968. Mutagenesis by acridine yellow in *Bacillus subtilis*. Genetics 59: 23-31.

STOECKENIUS, W. y ROWEN, R. 1961. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. J. Cell. Biol. 34: 365-393.

STOECKENIUS, W. y KUNAU, W. H. 1968. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell. Biol. 38: 337-357.

- STOECKENIUS, W. 1981. Walsby's square bacterium: fine structure of an orthigonal prokaryote. *J. Bacteriol.* 148: 353-360.
- STREISINGER, G., OKADA, Y., EMRICH, J., NEWTON, J., TSUGITA, A., TERZAGHI, E. y INOVYE, M. 1966. Frameshift mutations and the genetic code. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 31: 77-84.
- STRIGINI, P. 1965. On the mecanism of spontaneous reversion and genetic recombination in bacteriophage T4. *Genetics* 52: 759-776.
- STUART, K. D. y HANSON, E. D. 1967. Acriflavine induction of dyskinetoplasmy in *Leptomonas karyophilus*. *J. Protozool* 14: 39-43
- SUNDERG, S. A., BOGOMOLNI, R. A. y SPUDICH, J. L. 1985. Selection and properties of phototaxis-deficient mutants of *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 164: 282-287.
- SUTHERLAND, B. M. y SUTHERLAND J. C. 1969. Mechanism of inhibition of pyrimidine dimers formation in deoxyribonucleic acid by acridine dyes. *Biophys. J.* 9: 292-302.

SZABO, A. G., SELIGY, U. L., NASTASI, M. y YIP, R. W. 1975.

The requeriment of intact double helical structure for primary binding in quinacrine-nucleic acid complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 830-836.

TAIT, M. I., SUTHERLAND, I. W. y CLARLE-STURMAN, A. J. 1986.

Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xantomonas campestris*. *J. Gen Microbiol.* 132: 1483-1492.

TERZAGHI, E., OKADO, Y., STREISINGER, G., EMRICH, J., INOVYE,

M. y TSUGITA, A. 1966. Change of a sequence of amino acids in phage T4 lysozyme by acridine-induced mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 56: 500-507.

THOMSON, S. H., EMMET, E. A. y FOX, S. H. 1974.

Photodestruction of mouse epithelial tumors after oral acridine orange and argon baser. *Cancer Res.* 34: 3124-3127.

TINDALL, B. J., MILLS, A. A. y GRANT, W. D. 1980. An

alkalophilic red halophilic bacterium with a low magnesium requirement from Kenyan soda lake. *J. Gen. Microbiol.* 116: 257-260.

TINDALL, B. J. ROSS, H. N. M. y GRANT, W. D. 1984.

*Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen nov.  
two new genera of haloalkalophilic archaeobacteria.  
Syst. appl. Microbiol. 5: 41-57.

TITTAWEHA, I. P. B. 1985. Mutant of *Escherichia coli* with  
inusual patterns of *rpoB,C* expression in response to  
rifampicin and acridine orange. Mol. Gen. Genet. 200:  
114-117.

TOMLINSON, G. A. y HOCHSTEIN, L. I. 1976. *Halobacterium*  
*saccharovorum* sp. nov. a carbohydrate-metabolizing  
extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol.  
22: 587-591.

TOMLINSON, G. A., JAHNKE, L. L. y HOCHSTEIN, L. I. 1986.  
*Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely  
halophilic denitrifying bacterium. Int. J. Syst.  
Bacteriol. 36: 66-70.

TORNABENE, T. G., KATES, M., GELPI, E. y ORO, J. 1969.  
Ocurrence of squalene, di and tetrahydrosqualenes and  
vitamin Mk-8 in an extremely halophilic bacterium,  
*Halobacterium cutirubrum*. J. Lipid. Res. 10: 294-303.

TORREBLANCA, M., RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., VENTOSA, A.,  
KAMEKURA, M. y KATES, M. 1986. Classification of non-  
alkalophilic halobacteria based on numerical taxonomy

and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen, nov. Syst. Appl. Microbiol. 8: 89-99.

TORSVIK, T. y DUNDAS, I.D. 1974. Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. Nature 248: 680-681.

TORSVIK, T. y DUNDAS, I. D. 1980. Persisting phage infection in *Halobacterium salinarium* Str. 1. J. Gen. Virol. 47: 29-36.

TORSVIK, T. 1982. Characterization of four bacteriophages for halobacterium, with special emphasis on phage SH1. In: "Archaeobacteria". Kandler, O. (Ed). Gustav Fischer, Stuttgart. p. 351.

TUBBS, R. K., DITMARS, Jr, W. E. y van WINKLE, Q. 1964. Heterogenicity of the interaction of DNA with acriflavine. J. Mol. Biol. 9: 545-557.

Van DUUREN, B. L., SIVAK, A., KATZ, C. y MELEBIONNE, S. 1969. Tumorigenicity of acridine orange. Br. J. Cancer. 23: 587-590.

WALSBY, A. E. 1980. A square bacterium. Nature (London). 283: 69-71.

WALTERS, L. L., BUDIN, R. E. y PAULL, G. 1986. Acridine-orange to identify *Campylobacter pyloridis* in formalin fixed, parafim-embedded gastric biopsies. Lancet 1: 42.

WARING, M. 1970. Distorsion of DNA structure and function by intercalating drug molecules. Proc. Int. Congr. Pharmacol 4th. 1969. 1: 308-317.

WEIDINGER, G., KLOTZ, G. y GOEBEL, W. 1979. A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation. Plasmid 2: 377-386.

WEIDINGER, G., PFEIFER, F. y GOEBEL, W. 1982. Plasmid in halobacteria: restriction maps. Methods Enzymol. 88: 374-379.

WHITMAN, W. B. 1985. Methanogenic bacteria. In: "The bacteria, Vol VIII: Archaeobacteria." Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (Eds). Academic Press. Orlando.

WOESE, C. R. y FOX, G. E. 1977. Phylogenetic, structure of the prokariotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5088-5090.

WOESE, C. R., MAGRUM, L.J. y FOX, G. E. 1978. Archaeobacteria. J. Mol. Evol. 11: 245-252.

WOESE, C. R. 1981. Archibacterias. Investigación y Ciencia, 59: 48-61.

WOHLFARTH, A., SEVERIN, J. y GALINSKI, E. A. 1989. Screening for compatible solutes of halophilic eubacteria. In: "Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology". Da Costa, M.S., Duarte, J.L. y Williams, R. A. D. Elsevier, London. p. 421.

WOLFE, R. S. 1971. Microbial formation of methane. Adv. Microbiol. Physiol. 6: 107-146.

WOLFE, R. S. 1979. Methanogens: A suprising microbial group. Antonie van Leuwenhoek 45: 353-364.

YU, I. K. y KAWAMURA, F. 1987. *Halomethanococcus doii* gen. nov., sp. nov., an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 303-310.

ZHILINA, T. N. y ZAVARZIN, G. A. 1987. *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. The extremely halophilic methanogenic archaeobacterium, Dokl. Akad. Nank. SSSR 293: 464-468.

ZILLIG, W., STETTER, K.O., SCHNABEL, R., MADON, J. y GIERL, A. 1982a. Transcription in archaeobacteria, Zbl. Bakt.

Mik. Hyg. Abt. I., Orig. C3: 218-227.

ZILLIG, W., STETTER, K.O., SCHNABEL, R. y THOM, M. 1985. DNA-dependent RNA polymerases of the archaeobacteria, In: The archaeobacteria. Vol VIII: Archaeobacteria. Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (Eds). Academic Press, Orlando.

ZILLIG, W., KLENK, H. P., PAHER, P., PÜHLER, G. Y GROPP, F. 1989. The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaeobacteria eukaryotes and eubacteria. Can. J. Microbiol. 35: 73-80.

ZUFFEREY, J., RIME, B., FRANCIOLI, P. y BILLE, J. 1988. Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infection by direct acridine orange staining of catheter tip. J. Clin. Microbiol. 26: 175-177.



° PURIFICACION BOLOIX CARLOS-ROCA  
"EFECTOS DE LA NARANJA DE ACRIDINA EN  
AMOEBACTER MORRHUAE, HALOARCUA CALIFORNIAE,  
HALOBACTERIUM HALOBIUM Y HALOCOCCUS MORRHUAE"

APTO "CUM LAUDE"

24

Septiembre

90

R. Bellopin

[Signature]

[Signature]

U. B. B. B. B.

[Signature]

[Signature]

[Signature]